

Universidad Autónoma de Madrid  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Molecular



TESIS DOCTORAL

Caracterización Molecular de Modelos  
Múridos de Carcinomas Escamosos de  
aplicación Preclínica

Olga Bornachea Gómez  
Madrid, 2015



Universidad Autónoma de Madrid  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Molecular



TESIS DOCTORAL

# Caracterización Molecular de Modelos Múridos de Carcinomas Escamosos de aplicación Preclínica

VºBº directores de Tesis

Dr. Jesús M<sup>a</sup> Paramio González

Dra. Mirentxu Santos Lafuente

Olga Bornachea Gómez  
Madrid, 2015





**El trabajo experimental presentado en esta memoria ha sido realizado gracias a la financiación de la beca FPI (BES-2009-025370) del Ministerio de Economía y Competitividad, en la División de Biomedicina Epitelial del Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT), bajo la dirección del Dr. Jesús M<sup>a</sup> Paramio González y la Dra. Mirentxu Santos Lafuente.**



*A mi madre*



*Resumen / Summary*



# Resumen

---

La epidermis es un epitelio estratificado que presenta numerosas patologías, entre ellas el cáncer, representando los tumores originados en este tejido más de la mitad de los tumores diagnosticados anualmente.

Los modelos animales constituyen una herramienta esencial para el estudio del cáncer ya que permiten obtener información para comprender cómo un gen homólogo puede causar o contribuir a la enfermedad en humanos. Los modelos múridos  $p53^{\Delta CE}$  y  $Rb^{\Delta CE};p53^{\Delta CE}$  desarrollan tumores epidérmicos en ocasiones indiferenciados y con alta capacidad metastásica que, a nivel transcripcional, muestran una gran similitud con múltiples tumores humanos de mal pronóstico.

Diversos estudios han relacionado el supresor tumoral p53 con la desregulación de microARNs implicados en los procesos de transición epitelio-mesénquima (TEM) y metástasis. Además, los tumores de los modelos deficientes en p53 en epidermis presentan una temprana represión de p63 cuya isoforma predominante en los queratinocitos de la capa basal es  $\Delta Np63\alpha$ .

Nuestros resultados indican que miR21 contribuye a proporcionar capacidad metastásica a los tumores de piel de ratones deficientes en p53. El aumento de expresión de miR21 se correlaciona con vías de señalización que pueden ser inhibidas farmacológicamente. Además, observamos que la expresión de miR21 está elevada en los tumores de pulmón metastásico humanos con mal pronóstico.

Asimismo, observamos que la expresión de  $\Delta Np63\alpha$  en las células deficientes en p53 reduce parcialmente el comportamiento metastásico, probablemente a través de la modulación de la expresión de genes y microARNs que intervienen en el proceso de TEM. Todo esto hace de los modelos animales deficientes en p53 en epidermis candidatos para análisis preclínicos de tumores metastásicos humanos caracterizados por la alteración de *TP53*.

Finalmente desarrollamos un modelo en el que se eliminan los miembros de la familia retinoblastoma en las células basales de epitelios estratificados de forma inducible por tamoxifeno,  $Rb1^{F/F};Rb12^{F/F};Rb1^{-/-};K14Cre^{Ert2}$  (TKO). Previamente nuestro laboratorio había demostrado que en ausencia de pRb la malignización tumoral ocurría cuando se produce la pérdida de p53. A altas dosis de tamoxifeno estos animales presentan una letalidad temprana. Cuando ajustamos la dosis, los animales muestran un fenotipo extremo caracterizado por una fuerte hiperplasia e hiperqueratosis y el desarrollo de carcinomas espontáneos. Además, presentan esplenomegalia y desarrollo de timomas. La caracterización del modelo TKO nos ha mostrado nuevos aspectos sobre las funciones de la familia retinoblastoma en piel y más en concreto del gen *Rb12*, que merecen ser objeto de futuras investigaciones.

# Summary

---

The epidermis is a stratified epithelium affected by numerous pathologies, including cancer, being the tumors originated in this tissue more than half of the epithelial tumors diagnosed every year.

Animal models are an essential tool for cancer research, as they provide information to understand how a homologous gene may cause or contribute to the disease in humans. The  $p53^{\Delta CE}$  and  $Rb^{\Delta CE};p53^{\Delta CE}$  murine models develop undifferentiated epidermal tumors with high metastatic potential that show a strong transcriptional similarity to many human tumors with poor prognosis.

Numerous studies have associated the p53 tumor suppressor with deregulation of microRNAs involved in the epithelial-mesenchymal transition (EMT) and metastasis processes. Furthermore, tumors in  $p53^{\Delta EC}$  models show an early repression of p63 whose predominant isoform in keratinocytes of the basal layer is  $\Delta Np63\alpha$ .

Our results indicate that miR21 helps to provide metastatic capacity to p53-deficient mouse skin tumors. The increased expression of miR21 correlates with active signaling pathways that can be inhibited pharmacologically. Moreover, miR21 expression is elevated in human metastatic lung tumors with poor prognosis.

Besides, we also show that  $\Delta Np63\alpha$  expression in p53-deficient cells partially reduces the metastatic behavior, most probably through the modulation microRNAs and transcription factors involved in the EMT process. These facts point to p53-deficient epidermal animal models as excellent candidates for preclinical analysis of human metastatic tumors characterized by *TP53* alterations.

Finally we developed a model in which the three members of the retinoblastoma family are ablated in the basal cells of stratified epithelia in a tamoxifen inducible manner:  $Rb1^{F/F}; Rbl2^{F/F}; Rbl1^{-/-}; K14CreErT2$  (TKO). Previously our laboratory had shown that, in the absence of pRb, malignant conversion occurred when p53 is lost. At high doses of tamoxifen these animals show early lethality. When we adjust the dose, the animals show an extreme phenotype characterized by a strong hyperplasia and hyperkeratosis and development of spontaneous carcinomas. Furthermore, they show splenomegaly and development of thymoma. The characterization of the TKO model has provided us new aspects of the skin functions of the retinoblastoma family and specifically the *Rbl2* gene, which deserve future research.



## *Abreviaturas*



# Abreviaturas

---

ADN	Ácido DesoxirriboNucleico.
ADNc	Ácido DesoxirriboNucleico complementario
Akt	Serina-treonina quinasa, del retrovirus Akt 8
ARN	Ácido RiboNucleico.
ARNm	Ácido RiboNucleico mensajero.
Bax	Del inglés, <i>Bcl2-associated x protein</i> . Proteína x asociada a Bcl2.
Bcl2	Del inglés, <i>B-cell lymphoma 2</i> .
BrdU	Bromo-deoxiUridina.
BSA	Del inglés, <i>Bovine Serum Albumine</i> . Seroalbúmina bovina.
CCB	Carcinomas de Células Basales
CCE	Carcinoma de Células Escamosas
CDH	Cadherina
CDK	Del inglés, <i>Cycling-Dependent Kinases</i> . Quinasas dependientes de ciclinas.
ChIP	Del inglés, <i>Chromatin Immunoprecipitation</i>
CIEMAT	Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas
CPCNP	Cáncer de Pulmón de Células No Pequeñas
DAPI	Del inglés, <i>4, 6 DiAmidin-2-Phenyl-Indole</i> . 4,6 diamidino-2-fenil-indol.
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DP	Del inglés, <i>Dimerization Partner</i>
EDTA	Etilén-diamino-tetra-acetato.
EGF	Del inglés, <i>Epidermal Growth Factor</i> . Factor de crecimiento epidérmico
EGTA	Etilén-glicol-tetra-acetato.
EMEM	Del inglés, <i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>
ERK	Del inglés, <i>extracellular signal- regulated kinase</i> . Quinasa regulada por señal extracelular
FACS	Del inglés, <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> . Clasificación de células activadas por fluorescencia.
FELASA	Del inglés, <i>Federation of European Laboratory Animal Science Associations</i>
FITC	Del inglés, <i>Fluorescein IsoThiCyanate</i> . Isotiocianato de fluoresceína.
GFP	Del inglés, <i>Green Fluorescent Protein</i> . Proteína verde fluorescente.
GUSB	$\beta$ -glucuronidasa
HEPES	Del inglés, <i>N2-HydroxyEthylPiperazine-N'-2-EthaneSulphonic acid</i> . Ácido N2-hidroxietilpiperacín-N'-2-etanosulfónico.
H&E	Hematoxilina/Eosina.
K	Del inglés, <i>Keratin</i> . Queratina.
K-ras	Del inglés, <i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i> .
LOH	Del inglés, <i>Loss Of Heterozygosity</i> . Pérdida de heterocigosidad
mTOR	Del inglés <i>mammalian target of rapamycin</i>
NF- $\kappa$ B	Del inglés, <i>Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> . Factor Nuclear potenciador de las cadenas ligeras Kappa de las células B activadas
NP40	Octyl phenoxy polyethoxyethanol.
OCT	Del inglés, <i>Optimal Cutting Temperature</i> . Temperatura óptima de corte.
OEBA	Órgano Encargado del Bienestar Animal
p19Arf	Del inglés, <i>p19-alternate reading frame</i> . Marco de lectura alternativo p19.
PAGE	Del inglés, <i>PolyAcrilamide Gel Electrophoresis</i> . Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Del inglés, <i>Phosphate Buffered Saline</i> . Tampón fosfato salino.
PCR	Del inglés, <i>Polymerase Chain Reaction</i> . Reacción en cadena de la polimerasa.
pRb	Proteína del retinoblastoma
PTEN	Del inglés, <i>Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten</i> .

	Fosfatasa homóloga de la tensina delecionada del cromosoma 10.
Rb	Retinoblastoma
Rbl	Del inglés, <i>Retinoblastoma like</i> .
SCC	Del inglés, <i>Squamous Cell Carcinoma</i> . Carcinoma escamoso.
SDS	Del inglés, <i>Sodium Dodecyl-Sulphate</i> . Dodecil sulfato sódico.
SFBI	Suero Fetal Bovino inactivado
SpCC	Del inglés, <i>Spindle Cell Carcinoma</i> . Carcinoma de células fusiformes.
Stat3	Del inglés, <i>Signal transducer and activator of transcription 3</i> .
TAD	Del inglés, <i>transactivation domain</i> . Dominio de transactivación
TBE	Del inglés, <i>Tris-Borate-EDTA</i> , Tris-borato-EDTA.
TBS	Del inglés, <i>Tris Buffered Saline</i> , Tampón Tris salino.
TE	Tris-EDTA
TEM	Transición epitelio-mesénquima.
TGF	Del inglés, <i>Tumor Growth Factor</i> . Factor de crecimiento tumoral.
TME	Transición mesénquima-epitelio.
TMX	Tamoxifeno
TP53	Del inglés, <i>Tumor protein 53</i> . Nombre del gen en humano.
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano.
Trp53	Del inglés, <i>Transformation related protien 53</i> . Nombre del gen en ratón.
Wnt	Del inglés, <i>Wingless/Int</i> . Vía de Wingless.
ZEB	Del inglés, <i>Zinc finger E-box-binding</i> .
ΔCond	Deleción condicional en epidermis
ΔInd	Deleción Inducible en epidermis.
ΔEpi	Deleción en Epidermis.
ΔCE	Deleción Condicional en Epidermis.

*Índice*



# Índice

<b>Introducción</b>	1
1. El tejido epitelial	1
1.1. Estructura de los epitelios estratificados	1
1.2. Marcadores epiteliales y diferenciación	2
2. El cáncer	3
2.1. Tumores epiteliales	5
2.2. La epidermis de ratón como modelo en cáncer de piel	5
3. El proceso de transición epitelio-mesénquima	6
4. Metástasis	7
5. Modelos murinos para el estudio de cáncer de piel	8
6. La familia retinoblastoma	10
6.1. La familia retinoblastoma en el control de ciclo celular	11
6.2. La familia retinoblastoma y el cáncer	12
7. El supresor tumoral p53	13
7.1. p53 y el cáncer	14
7.2. La familia p53	15
7.3. p63 en el cáncer	15
8. Conexión funcional entre la familia de retinoblastoma y p53 en modelos animales	16
9. Los microARNs	18
9.1. Implicación de los microARNs en TEM y metástasis	19
<b>Objetivos</b>	21
<b>Materiales y métodos</b>	23
<i>Animales de experimentación</i>	23
1. Líneas de animales transgénicos	23
1.1. Establecimiento de la línea de animales <i>Rb1<sup>F/F</sup>;Rbl2<sup>F/F</sup>;Rbl1<sup>-/-</sup>;K14creERT2 (TKO)</i>	23
1.2. Mantenimiento de líneas de animales transgénicos	23
2. Extracción de ADN genómico	24
3. Genotipado de los animales	24
4. Aplicación tópica de tamoxifeno para inducir recombinación en epidermis de ratones TKO	26
5. Incorporación de BrdU <i>in vivo</i>	26
6. Toma de muestras	26
7. Ensayos de tumorigénesis <i>in vivo</i>	27
8. Extirpación de tumores <i>in vivo</i>	27
9. Ensayos de desarrollo de metástasis	28
<i>Cultivos celulares</i>	28
10. Líneas tumorales	28
10.1. Generación y mantenimiento	28
10.2. Tratamientos con drogas	28
10.3. Transfección de antimir miR-ZIP-21 en la línea tumoral 940T	29
10.4. Generación de la línea celular 940ΔNp63α	29
10.4.1. Producción de vectores lentivirales por transfección transitoria de células 293T	30
10.4.2. Recogida de sobrenadantes infectivos	30
10.4.3. Infección de células 940T	30

11. Otras líneas celulares.....	31
11.1. Línea celular CoCa.....	31
11.2. Línea celular HaCat.....	31
11.3. Línea celular PB.....	31
11.3.1. Transfecciones en las células PB.....	31
11.4. Línea celular 293T.....	32
11.5. Mantenimiento de los cultivos.....	32
12. Criopreservación de las células.....	32
13. Estudios de migración/invasión.....	32
<i>Estudio del material biológico.....</i>	<i>33</i>
14. Análisis histológico y técnicas de inmunodetección.....	33
14.1. Anticuerpos.....	34
15. Extracción de proteínas y análisis por western blot.....	35
16. Análisis de expresión génica y de microARNs mediante qRT-PCR.....	37
16.1. Aislamiento de ARN y microARNs.....	37
16.2. Retrotranscripción.....	37
16.3. PCR a tiempo real.....	37
17. Análisis de microarrays.....	39
18. Citometría de flujo.....	39
18.1. Estudio en sangre periférica y timo.....	39
<b>Resultados.....</b>	<b>41</b>
1. Papel de miR21 en el desarrollo tumoral y su potencial metastásico.....	41
1.1. Sobreexpresión de miR21 en queratinocitos inmortalizados.....	44
1.2. Efecto de la expresión incrementada de miR21 en queratinocitos transformados de ratón; células PB.....	46
1.3. Consecuencias del bloqueo de miR21 en células tumorales de ratón $Rb^{\Delta CE}; Trp53^{\Delta CE}$ .....	50
2. Tratamientos in vitro para restaurar la expresión de miR21 en tumores y células deficientes en p53.....	54
3. La expresión de miR21 aumenta en el cáncer de pulmón metastásico en humanos.....	56
4. Posible papel de p63 en el desarrollo tumoral y el potencial metastásico.....	58
4.1. Expresión de p63 en tumores espontáneos y metástasis.....	58
4.2. Tratamientos farmacológicos para restaurar la expresión de p63 en células deficientes en p53.....	61
4.3. Consecuencias funcionales de la sobreexpresión de $\Delta Np63\alpha$ en células tumorales 940T.....	63
4.4. Análisis in vivo de la capacidad tumorigénica de la sobreexpresión de $\Delta Np63$ en células tumorales 940T.....	69
5. Caracterización del modelo múdo deficiente en los miembros de la familia retinoblastoma en epitelios estratificados.....	74
5.1. Inducción de la recombinación mediada por t28amoxifeno por aplicación tópica.....	74
5.2. Fenotipo externo de los animales TKO tras el tratamiento con tamoxifeno.....	75
5.3. Caracterización de la piel en animales TKO.....	77
5.3.1. Diferenciación y proliferación epidérmica.....	79
5.4. Efecto de la eliminación de los genes de la familia retinoblastoma en timo.....	82
5.5. Efectos en el bazo de la eliminación de los genes de la familia retinoblastoma.....	87
<b>Discusión.....</b>	<b>89</b>
Papel de miR21 en metástasis.....	89
Papel de p63 en metástasis.....	92



Caracterización del modelo TKO.....	94
<b>Conclusiones.....</b>	<b>99</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>101</b>
<b>Anexo.....</b>	<b>117</b>



## *Introducción*



# Introducción

---

## 1. El tejido epitelial

El tejido epitelial es el encargado de recubrir el organismo tanto externamente (la piel) como internamente (pulmones, estómago, intestino, etc.), además de formar las glándulas. De manera general, los tejidos epiteliales de recubrimiento tienen función protectora frente a agresiones externas actuando en muchos casos como barrera física. Los epitelios están constituidos principalmente por queratinocitos, aunque también presentan melanocitos, células de Merkel y células de Langerhans.

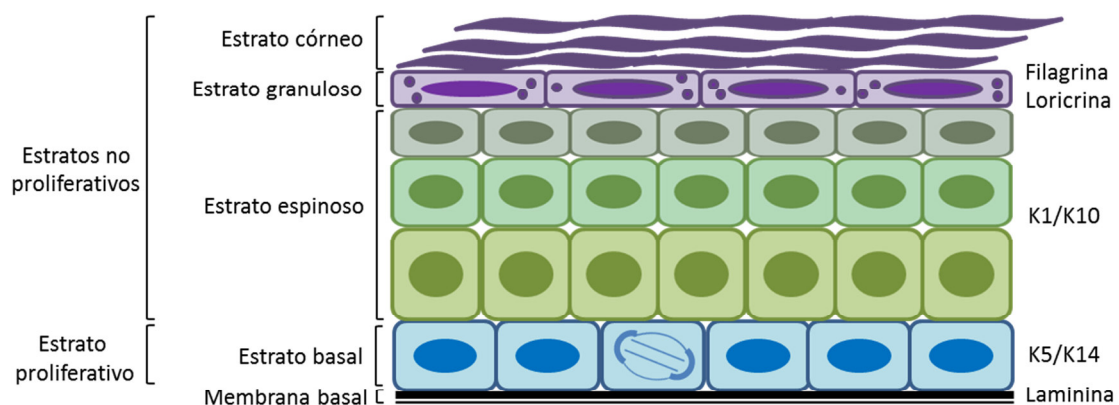
### 1.1. Estructura de los epitelios estratificados

Los epitelios estratificados, donde el tipo celular predominante es el queratinocito, presentan una estructura en capas altamente organizada y compartimentada que se encuentra en continuo proceso de renovación. Esta renovación celular proporciona un mecanismo de defensa para evitar que las agresiones externas produzcan daños en las células epiteliales que afecten a las células madre encargadas de mantener el tejido.

La epidermis es un **epitelio estratificado queratinizado** organizado en 4 capas bien diferenciadas (fig.1): basal, espinosa, granulosa y córnea, donde los queratinocitos se encuentran en distintos estadios de diferenciación. La **capa basal** está formada por una capa de células cúbicas, las únicas con capacidad proliferativa y que dan lugar a todas las células del tejido. Es la capa más interna y está separada del tejido subyacente por la lámina basal a la que los queratinocitos se unen a través de hemidesmosomas. Sobre ésta se encuentra la **capa espinosa**, formada por queratinocitos procedentes de la capa basal que ya no se dividen y que han comenzado el proceso de diferenciación; los queratinocitos de esta capa, cuya forma es poliédrica, están conectados entre sí mediante gran cantidad de desmosomas. La **capa granulosa** está formada por queratinocitos con forma romboide que se caracterizan por la presencia en el citoplasma de numerosos gránulos de queratohialina y gránulos lamelares. Por último, la capa más externa y máxima responsable de la función protectora es la **capa córnea**, que está formada por células muertas que adquieren forma aplanada y pierden el núcleo y otros orgánulos y forman una multicapa de células diferenciadas que quedan suspendidas en una matriz lipídica. Las células más internas de esta capa aún conservan algunos desmosomas, pero las más externas carecen de

ellos y tienden a descamarse por fricción y son reemplazadas por células procedentes de capas inferiores.

Así, en condiciones normales, un queratinocito de la capa basal, no diferenciado y con capacidad proliferativa, recibe determinadas señales que promueven que se inicie el proceso de migración hacia capas superiores a la vez que pierde completamente su capacidad proliferativa y diferencia de forma gradual hasta transformarse en queratinocito córneo que finalmente se desprende (Rinnerthaler et al., 2014).



**Figura 1. La epidermis.** Esquema general de la epidermis en el que se representan los estratos que la constituyen y las proteínas específicas marcadoras que se expresan en cada uno de ellos.

Los **epitelios estratificados no queratinizados** (epitelio de la mucosa bucal, esófago, lengua, faringe, vagina, etc.) sólo presentan tres capas, no existiendo un estrato córneo. En estos epitelios también las células con capacidad proliferativa se encuentran en la capa basal y van perdiendo esa capacidad según migran hacia capas superiores y se diferencian.

## 1.2. Marcadores epiteliales y diferenciación

Durante el proceso de diferenciación se producen cambios en la expresión génica de los queratinocitos según migran de la capa basal a capas superiores. Los diferentes estadios de diferenciación están caracterizados por la síntesis de diversas proteínas que sirven como marcadores específicos de cada estrato. Algunas de estas proteínas son filamentos intermedios denominados queratinas. Estas pueden ser de tipo I o queratinas ácidas o de tipo II o queratinas básicas, siendo necesaria para la formación del filamento la dimerización de ambas. La expresión de queratinas específicas influye en el queratinocito afectando a funciones celulares esenciales que incluyen proliferación, transducción de señales o apoptosis.

Las proteínas de los epitelios estratificados queratinizados que se emplean para caracterizar las diferentes capas (fig.1) son, entre otras:

- Queratinas 5 y 14 (K5/K14): se expresan en los queratinocitos de la capa basal. En las capas superiores se pierde la expresión de estas queratinas. Por tanto las queratinas 5 y 14 se emplean como marcadores de las células con capacidad proliferativa (Byrne et al., 1994; Ramirez et al., 1994).
- Queratinas 1 y 10 (K1/K10): se expresan en el estrato espinoso y se emplean como marcadores de diferenciación temprana. Bajo la influencia de estímulos hiperproliferativos su expresión se reduce drásticamente (Santos et al., 2002).
- Loricrina y filagrina se sintetizan en el estrato granuloso y son marcadores de diferenciación terminal. La loricrina forma parte de la envuelta celular, y la filagrina de los gránulos de queratohialina (Steinert and Marekov, 1995).

También se emplean otras proteínas como marcadores de otros tipos de epitelios, estructuras anejas o de situaciones anómalas como:

- Queratina 6 (K6): se expresa en folículos pilosos y en epitelios estratificados internos y su expresión aumenta en epitelios que están en estado hiperproliferativo (Ramirez et al., 1995).
- Queratina 8 (K8): se expresa de manera habitual en epitelios simples y en estados embrionarios (en ectodermo, precursor de tejidos epiteliales) y está relacionada con la conversión maligna asociada a la activación de Ha-ras en epidermis (Hutton et al., 1998).

La expresión de diferentes proteínas en momentos concretos permite hacer un estudio más detallado del potencial de malignidad de un tumor.

## 2. El cáncer

El cáncer se caracteriza por un ciclo celular descontrolado que conlleva a una proliferación celular excesiva. Los genes implicados en el desarrollo del cáncer son aquellos cuya función está relacionada con procesos de regulación de la proliferación, apoptosis o reparación del ADN y se clasifican en: proto-oncogenes, genes supresores de tumores y genes implicados en la reparación del ADN (Hanahan and Weinberg, 2000; Hanahan and Weinberg, 2011).

Los **proto-oncogenes** codifican para proteínas implicadas en la proliferación celular y/o la inhibición de la apoptosis. La expresión y actividad de los proto-oncogenes está sometida a un

estricto control, puesto que la activación anómala de estos genes puede conducir a la proliferación y supervivencia celulares sin atender a control alguno pasando a denominarse oncogenes. Los **genes supresores de tumores** codifican para proteínas implicadas en el correcto progreso del ciclo celular o en la inducción de apoptosis como es el caso de p53, que se induce en respuesta al daño celular y promueve la parada del ciclo y la inducción de apoptosis o la entrada en senescencia (Vogelstein et al., 2000). En general, el comportamiento de los oncogenes es dominante, mientras que en el caso de los genes supresores de tumores es necesario que ambos alelos del gen estén alterados para que la pérdida de la función sea completa. Los **genes de reparación del ADN** son los responsables de corregir los errores que se producen durante el proceso de replicación debido a la incorporación errónea de nucleótidos, o como consecuencia del daño producido por agentes tóxicos. Las mutaciones que se producen en estos genes reparadores conducen a la aparición de múltiples alteraciones en el genoma. Estas mutaciones tendrán efectos cancerígenos cuando impliquen a proto-oncogenes o genes supresores de tumores favoreciendo el desarrollo neoplásico. Además, existen otros procesos que juegan un importante papel en el desarrollo tumoral como los mecanismos de muerte celular que funcionan como barrera para los procesos cancerosos mientras que el desarrollo de una vasculatura adecuada permite el crecimiento de los tumores (Hanahan and Weinberg, 2000; Hanahan and Weinberg, 2011).

El cáncer constituye la segunda causa de mortalidad en los países desarrollados, en los que una de cada cinco personas fallece debido a esta enfermedad. Se han descrito diversos factores de riesgo físico, químico y medioambiental que contribuyen tanto a la aparición como a la aceleración de los procesos neoplásicos. Sin embargo, el principal factor de riesgo es el envejecimiento, ya que dos terceras partes de todos los cánceres afectan a personas mayores de 65 años.

Si bien cualquiera de los 200 tipos celulares que constituyen nuestro organismo es susceptible de generar un tumor, aproximadamente el 80% de los tumores se originan a partir de células epiteliales, denominándose carcinomas. En particular, el cáncer de piel no melanoma constituye el tipo de cáncer más abundante en Europa y otros países occidentales (Eisemann et al., 2014; Lomas et al., 2012), aumentando su incidencia cada año, debido a la adquisición de nuevas costumbres, como la exposición prolongada a la radiación solar. Por ello, se hace evidente la necesidad de estudiar los mecanismos moleculares responsables de la aparición de tumores de origen epitelial en piel.



## 2.1. Tumores epiteliales

La frecuencia de aparición de tumores en los distintos tipos celulares y tejidos del organismo depende, entre otros factores, de la tasa de renovación de los mismos o de su exposición a carcinógenos externos. En este sentido, el epitelio, al recubrir toda la superficie corporal, tanto externa como interna, es un tejido sometido a un constante desgaste y permanente renovación que está expuesto a las agresiones del medio externo. Esta es la causa principal de que el cáncer de piel sea una de las enfermedades con mayor prevalencia a nivel mundial (Parkin, 1998).

En el caso de la epidermis, los tumores se clasifican principalmente en carcinomas de células basales (CCB) y en carcinomas epidermoides o escamosos (CCE). Los CCE son menos frecuentes pero presentan características más malignas y una mayor tasa de metástasis.

La progresión de los carcinomas pasa por distintas etapas. En algunas células se producen alteraciones genéticas que les confieren mayor capacidad proliferativa dando lugar a hiperplasia. En ciertos casos, estas células progresan a células displásicas que presentan anomalías morfológicas y conducen a la pérdida de la estructura del tejido. Con el tiempo, estas células, así como el entorno que las rodea, pueden acumular más anomalías, dando lugar a carcinomas *in situ*, donde se observa aumento de desorganización y las células alteradas comienzan a atravesar la membrana basal. En algunos casos, el tumor localizado adquiere todavía más rasgos malignos que le otorgan capacidad invasiva del tejido circundante y la entrada de las células en el torrente sanguíneo o en la linfa. Estas pueden formar nuevos focos en otros órganos dando lugar a metástasis.

## 2.2. La epidermis de ratón como modelo en cáncer de piel

La epidermis es un tejido que prolifera, diferencia y estratifica de manera compartimentada (Leigh, Lane and Watt, 1994), encontrándose estos procesos perfectamente caracterizados mediante marcadores específicos lo que le proporciona unas características ideales como modelo de estudio. Al ser un tejido fácilmente accesible, en estudios con ratones permite la monitorización y seguimiento de tumores o lesiones de forma sencilla sin necesidad de herramientas de imagen o sacrificar al animal, y por otro lado posibilita el aislamiento de queratinocitos primarios para su estudio en cultivo. Además, el aislamiento y la caracterización de las secuencias reguladoras de las queratinas *in vivo*, han permitido su uso para dirigir la expresión de genes de interés de modo específico en las distintas capas de la epidermis (Ramirez et al., 1994; Ramirez et al., 1995; Sinha and Fuchs 2001).

Por otro lado, uno de los modelos que más ha contribuido a establecer la naturaleza secuencial del desarrollo neoplásico es el modelo de carcinogénesis química en piel de ratón. Por ello, este protocolo es una herramienta muy útil para dilucidar los mecanismos subyacentes de las neoplasias en general y del cáncer de piel en particular.

### 3. El proceso de transición epitelio-mesénquima

La conversión de un carcinoma *in situ* en un tumor con características metastásicas supone la puesta en marcha de un conjunto de fenómenos celulares, mediante los cuales, la célula pierde algunas de sus características epiteliales cambiando su morfología, motilidad, adhesión y expresión génica, adquiriendo propiedades mesenquimales. Este proceso, denominado transición epitelio-mesénquima (TEM), permite que la célula epitelial transformada adquiera propiedades migratorias e invasivas que conducirán a la metástasis. Los componentes celulares que forman parte de la maquinaria de adhesión celular son los principales protagonistas de la TEM ya que modulan los cambios de forma y movilidad de la célula (Thiery, 2002).

La TEM fue descrita por primera vez a partir de estudios *in vitro* en células epiteliales de córnea, en los que se observó la implicación de este fenómeno en procesos del desarrollo embrionario y en carcinogénesis (Hay, 1982). Durante el desarrollo embrionario, el proceso de TEM tiene lugar en la formación de determinados tejidos como son el mesodermo, la cresta neural y las válvulas del corazón entre otros. El proceso reverso a la TEM, o TME, también tiene lugar en determinados procesos durante el desarrollo y demuestra el gran nivel de plasticidad de las células a la hora de revertir el fenotipo de célula mesenquimal a epitelial y viceversa, tanto en condiciones normales como patológicas. Las señales responsables de inducir TEM durante la embriogénesis, son las que pueden llegar a estar implicadas en los procesos de invasión tumoral y metástasis.

Determinadas vías de señalización como las de Wnt, Hedgehog, Notch, NF- $\kappa$ B y TGF- $\beta$  están implicadas en el proceso de TEM y asumen un importante papel en la progresión tumoral y la metástasis (Moustakas and Heldin, 2007). Un evento crítico en la TEM es la desregulación de E-cadherina. Factores de transcripción como Snail, Slug, ZEB1, ZEB2, Twist1 y Twist2 son reguladores clave de la TEM ya que reprimen la expresión de *CDH1*, gen que codifica para E-Cadherina (Katoh and Katoh, 2008). Snail es el factor que juega un papel predominante en la inducción de la TEM en tumores primarios, mientras que el resto de los factores parecen estar implicados en mantener el fenotipo migratorio de las células tumorales. Además de favorecer la TEM, Snail induce proliferación y supervivencia celular necesarias para la progresión tumoral.

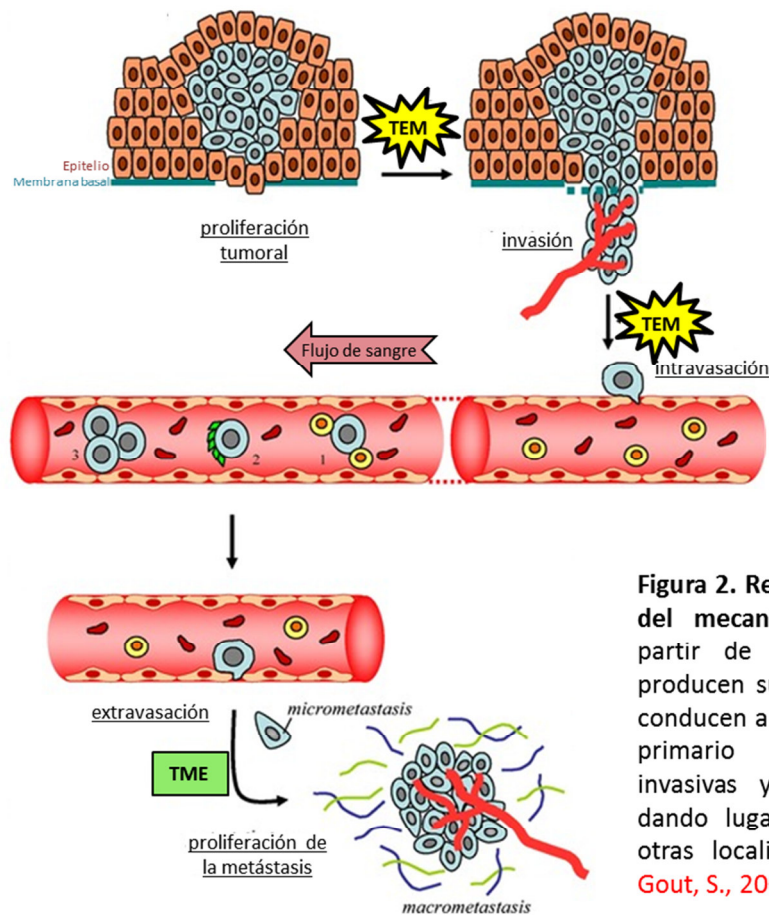
Diversos estudios indican que los factores Snail inhiben la respuesta apoptótica mediada por p53 reprimiendo la transcripción de genes proapoptóticos. También ha sido ampliamente estudiada la conexión entre Twist y ZEB en procesos de senescencia y ciclo celular, comportándose como antagonistas de apoptosis y senescencia revertiendo el bloqueo del ciclo celular inducido por p53, o inhibiendo p21 por vías independientes de p53 (Ansieau et al., 2008; Smit and Peeper, 2008).

## 4. Metástasis

La formación de metástasis es un proceso dinámico y complejo que comprende una serie de etapas (fig.2):

- Transformación inicial y crecimiento progresivo de las células neoplásicas.
- Vascularización masiva. Síntesis y secreción de factores proangiogénicos que establecerán el plexo neovascular a partir de los tejidos que rodean al tumor.
- Intravasación o invasión local del estroma vía sanguínea o linfática por algunas de las células tumorales iniciales.
- Separación y embolización de pequeños agregados de células tumorales. Las células que han sobrevivido a la circulación, al adherirse a las células endoteliales de los capilares o a la membrana basal subendotelial, quedan atrapadas en los lechos capilares de los órganos.
- Extravasación y migración de las células.

El proceso de formación de metástasis se completa con la posterior proliferación en el parénquima del órgano colonizado. Las micrometástasis tienen que desarrollar una red vascular, invadir y penetrar en los vasos sanguíneos y entrar en la circulación para seguir produciendo metástasis.



**Figura 2. Representación de las fases del mecanismo de metástasis.** A partir de un epitelio normal se producen sucesivas alteraciones que conducen a que las células del tumor primario adquieran propiedades invasivas y migren vía sanguínea dando lugar a focos tumorales en otras localizaciones (modificada de Gout, S., 2008).

Recientes estudios han permitido determinar algunas de las bases moleculares de la metástasis gracias a la utilización *in vivo* de células metastásicas humanas modificadas. De esta forma, entre otras cosas, se ha demostrado que las señales provenientes del microambiente del tumor primario intervienen en la progresión del proceso metastásico. Por ejemplo, la citoquina TGF- $\beta$  promueve la metástasis permitiendo la extravasación de las células cancerígenas desde los vasos sanguíneos y su entrada en pulmón (Padua et al., 2008). Otros estudios también han mostrado la implicación de los microARNs en procesos tumorigénicos de forma directa o indirecta (Botchkareva, 2012; Sand et al., 2010). De esta forma se amplían las posibilidades de encontrar tratamientos adecuados que frenen la metástasis en cáncer humano.

## 5. Modelos murinos para el estudio de cáncer de piel

Los modelos animales constituyen una herramienta esencial en todas las áreas de investigación biomédica desde el estudio de las enfermedades y el envejecimiento hasta la validación de nuevas dianas terapéuticas y el descubrimiento y ensayo de nuevos fármacos.

Las técnicas moleculares permiten el diseño de animales con modificaciones genéticas específicas, no solo cambios específicos en nucleótidos, sino que se pueden diseñar interruptores

genéticos para dirigir la expresión o ablación de cualquier gen en un tejido y un momento definidos. Estas estrategias contribuyen a una mayor comprensión de la función de genes en el desarrollo y patogenia de enfermedades (Sauer, 1998).

Los modelos knock-out convencionales pueden presentar limitaciones por causar letalidad embrionaria o perinatal asociada a la eliminación de genes con una función esencial, lo que impide, en muchos casos, el estudio del fenotipo en el animal adulto (Jonkers and Berns, 2002).

Usando el sistema Cre/LoxP se han generado modelos condicionales que permiten obtener la delección específica de un gen en un tejido concreto. Cre, es una recombinasa del bacteriófago P1, capaz de reconocer y escindir el gen de interés flanqueado por secuencias de ADN específicas, denominadas sitios *lox-P* (Sauer, 1998).

Por otra parte, los modelos animales inducibles o de tercera generación permiten controlar, no sólo de manera espacial (tejido-específica), sino también temporal, el momento en que se produce la alteración del gen de interés. Estos modelos resuelven, por un lado, aquellos casos en los que la letalidad embrionaria o perinatal es un problema, ya que el estudio puede llevarse a cabo en animales adultos, una vez se ha completado el desarrollo, y por otro, puede evitar los problemas derivados de la compensación funcional. Este proceso se produce, por ejemplo, cuando se delecionan genes durante el desarrollo lo que conduce a que otros genes adopten funciones asociadas al gen en estudio por aclimatación. En muchos casos, la compensación funcional conlleva el aumento de expresión o la inducción *de novo* de otros genes con función similar.

El grupo de E. Fuchs en el año 1999 describe y caracteriza la expresión de Cre inducible por tamoxifeno en piel bajo el promotor de la queratina K14 (Vasioukhin et al., 1999). Este modelo permite la delección de genes específicos en la epidermis de animales adultos, lo que puede ayudar a comprender mejor la biología del epitelio y avanzar en el conocimiento de los mecanismos involucrados en los carcinomas de células escamosas y basales. Esta tecnología proporciona la base para desarrollar modelos inducibles en otros tejidos en los que la actividad del promotor K14 es alta como, por ejemplo, en la córnea o el epitelio oral, lo que podría ser útil para la generación de modelos de ratón para varios tipos de cánceres epiteliales.

Por otra parte, hay pocos modelos animales para el estudio de los procesos de metástasis. En la mayoría de los casos, los modelos usados para identificar los mecanismos por los que las células cancerosas metastatizan, se realizan en los animales empleando células tumorales que se inyectan de forma intracardiaca o intravenosa, de modo que las células cancerosas pasan de

forma directa al torrente circulatorio (Kuperwasser et al., 2005). Otros abordajes se basan en implantaciones ortotópicas de líneas celulares con altas capacidades metastásicas (Citterio et al., 2012) o implantes subcutáneos de células tumorales para realizar el seguimiento del crecimiento tumoral y la capacidad metastásica de las células inyectadas (Segrelles et al., 2004). Sin embargo, el número de estudios realizados en modelos transgénicos es más limitado. Así, por ejemplo, se ha observado que en los modelos inducibles con sobreexpresión de K-ras y mutaciones en *Trp53* específicamente en epidermis se desarrollan tumores de piel agresivos que metastatizan formando focos epiteliales en pulmón (Caulin et al., 2007).

El desarrollo de nuevos medicamentos está estrechamente vinculado a la experimentación con modelos animales debido a la posibilidad de que recapitulen la mayoría de las características de una enfermedad humana y así poder testar la eficacia de las nuevas moléculas.

En el contexto de terapia antitumoral los animales transgénicos pueden satisfacer esas necesidades como herramientas de validación *in vivo*. Asimismo, la investigación *in vitro* a través de cultivos celulares, tanto humanos como murinos, permiten una aproximación de respuesta al fármaco previa al uso de modelos animales.

La posibilidad de crear un microambiente que simule las condiciones de desarrollo de tumores humanos, tanto en un contexto *in vitro* como *in vivo*, capacita estos modelos de estudio eficaces para el ensayo de nuevas drogas, descubrimiento de dianas terapéuticas y comprensión de los mecanismos de acción y respuesta a terapia.

## 6. La familia retinoblastoma

El gen retinoblastoma, *Rb1*, fue el primer gen supresor tumoral identificado. Se aisló a partir de un tumor infantil hereditario de retina del que tomó su nombre (Friend et al., 1986).

En las células de mamíferos, la familia retinoblastoma, cuyo principal miembro es pRb, está formada además por el gen *Rb1* (del inglés *Rb like*), que da lugar a la proteína p107, y el gen *Rb2* que codifica para la proteína p130. Los tres miembros de la familia presentan similitudes de estructura y función, aunque p107 y p130 están más estrechamente relacionadas entre sí y, en determinados contextos, llevan a cabo funciones distintas a las de pRb (Claudio et al., 2002; Dannenberg and te Riele, 2006; Ewen et al., 1991; Hannon et al., 1993).

Las proteínas de la familia retinoblastoma constan de un dominio amino terminal, una región *pocket* compuesta por dos dominios conservados, denominados A y B, separados por una región espaciadora y por una región carboxilo terminal. El dominio *pocket* es imprescindible para la funcionalidad de estas proteínas ya que es el que permite su unión a los factores de transcripción,

ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) (Lee et al., 1987; Mayol et al., 1993). p107 y p130 comparten un motivo en la región espaciadora que no está presente en la secuencia de pRb (Ewen et al., 1992; Faha et al., 1992; Hannon et al., 1993; Lees et al., 1992; Li et al., 1993; Mayol et al., 1993). Además comparten una secuencia próxima al extremo amino terminal que también está ausente en pRb. Estas diferencias pueden indicar la existencia de funciones específicas entre los diferentes miembros de la familia retinoblastoma.

## 6.1. La familia retinoblastoma en el control de ciclo celular

Las tres proteínas de la familia presentan unas características comunes; son reguladoras del ciclo celular, donde controlan la transición G1-S (Weinberg, 1995), son capaces de regular la transcripción de genes por unión a factores de la familia E2F y son dianas de oncoproteínas virales. Además de su importante papel como reguladores del ciclo celular (Morris and Dyson, 2001), pRb y p130, controlan la expresión de genes diana específicos y modifican la estructura de la cromatina, ya que funcionan como proteínas adaptadoras capaces de reclutar enzimas remodeladoras de la cromatina (Jori et al., 2005; Morris and Dyson 2001).

Las tres proteínas regulan su actividad por fosforilaciones llevadas a cabo por quinasas dependientes de ciclinas o CDKs (Classon and Dyson 2001; Goodrich, 2006; Grana et al., 1998; Lipinski and Jacks, 1999). Sin embargo, también existen diferencias entre ellas, tanto en su patrón de expresión como en su capacidad de unión a los distintos miembros de la familia E2F.

La expresión de las proteínas de la familia retinoblastoma varía en función de la etapa del ciclo celular o del tipo de tejido. Así, pRb es abundante en todas las fases del ciclo celular y se expresa en la mayoría de los tipos celulares pudiéndose detectar en proliferación, diferenciación y en células quiescentes a unos niveles relativamente constantes. Por otro lado, p130 se detecta a niveles elevados en células no proliferativas, mientras que los niveles de p107 son muy bajos en células quiescentes o senescentes, aumentando durante la proliferación (Cinti et al., 2000; Kondo et al., 2001; Paggi et al., 1996; Pertile et al., 1995).

La ausencia o inactivación funcional de las proteínas de la familia retinoblastoma ocasiona desregulación en diferentes dianas de E2F (Hurford et al., 1997). La superfamilia de los factores de transcripción E2F está formada por las familias E2F y DP (*dimerization partner*) (Frolov and Dyson, 2004). Los factores E2F poseen dominios de transactivación, así como de represión. Cuando se unen a las proteínas *pocket*, los factores E2F median la represión transcripcional y cuando se liberan de estas, pueden actuar como transactivadores, consiguiendo así la expresión de los genes diana (Chen et al., 2009). Por otra parte, la familia de proteínas DP consta de dos miembros: DP1 y

DP2 que no presentan actividad transcripcional por sí mismas pero funcionan como cofactores de las diferentes proteínas E2F, ya que dimerizan con ellas para ejercer su función reguladora. Existen al menos 8 factores E2F. Los factores E2F1-5 contienen ambos dominios (activación y represión) los factores E2F1-3a se clasifican como E2F activadores, mientras que E2F3b-6 son catalogados como represores siendo los factores de transcripción E2F1 y E2F4 los miembros más representativos de los grupos activadores y represores respectivamente. Por otra parte, los factores E2F1-E2F6 presentan un dominio de unión a proteínas DP que les permite unirse al ADN y, excepto el factor E2F6, un dominio de unión a proteínas *pocket*. Estas características los diferencian de los miembros de la familia E2F7 (a y b) y E2F8, que se pueden unir al ADN sin necesidad de formar heterodímeros con las proteínas DP y tampoco se unen a proteínas pocket.

La expresión de los factores E2F está regulada de un modo diferencial a lo largo del ciclo celular en base a la distinta afinidad que presentan por miembros de la familia retinoblastoma. Así, pRb se asocia fundamentalmente con E2F1, E2F2, E2F3 y E2F4; p107 lo hace preferentemente a E2F4 y E2F5 en células que están en ciclo (Lee et al., 2002; Lindeman et al., 1997; Moberg et al., 1996), mientras que, en células quiescentes, los niveles de p107 son generalmente bajos (Balciunaite et al., 2005). Por otro lado, p130 se une preferentemente a E2F5.

## 6.2. La familia retinoblastoma y el cáncer.

El producto del gen *Rb1*, pRb, es una fosfoproteína nuclear de 105 KDa que regula negativamente la progresión del ciclo celular. Posteriormente se ha descrito que el gen retinoblastoma está ausente, desregulado o funcionalmente inactivado en la práctica totalidad de los tumores humanos (Hanahan and Weinberg, 2000; Sherr and McCormick, 2002), convirtiéndose, por tanto, en uno de los más interesantes objetos de estudio en el campo del cáncer.

El papel de pRb en la supresión tumoral se basa en las siguientes observaciones: a) pRb bloquea la activación transcripcional de los factores E2F, los cuales, a su vez, regulan la transcripción de genes necesarios para la replicación celular (Dyson, 1998). b) pRb es el blanco de oncoproteínas virales que promueven la proliferación celular a través de la liberación de los factores E2F (Nevins, 1998). c) La vía que regula la actividad de pRb se encuentra alterada a diferentes niveles en la mayoría, si no en todos, los tumores.

Respecto a p107 y p130, en un principio se sugirió un papel secundario respecto a pRb debido a la práctica ausencia de mutaciones en los genes *Rb1* y *Rb2* en tumores primarios aunque si se habían observado deleciones o pérdida de heterocigosidad de p130 en algunas neoplasias



humanas que incluían cáncer de mama, hígado, próstata y ovario (Yeung et al., 1993), pérdida de la expresión de p130 en cáncer de pulmón (Caputi et al., 2002; Claudio et al., 2000), en linfomas (Leoncini et al., 1999) y en melanoma coroidal (Massaro-Giordano et al., 1999) y mutaciones en el gen *Rb12* en carcinomas nasofaríngeos y pulmonares (Claudio et al., 2000) siendo común una baja expresión de p130 en casi todas las células tumorales. Por otro lado, se habían registrado deleciones en p107 en líneas celulares de linfoma-B (Ichimura et al., 2000). Sin embargo, los datos de secuenciación masiva (Gao et al., 2013) han puesto de manifiesto que los genes *Rb11* y *Rb12* se encuentran mutados en variedad de tumores y con una incidencia muy alta como en el caso de *Rb11* en melanoma (<http://bit.ly/1GfMHD0>) y *Rb12* en cáncer de próstata (<http://bit.ly/1Dysnpk>).

Finalmente, se ha observado la aparición de tumores en animales deficientes en diferentes combinaciones de los distintos miembros de la familia de retinoblastoma (Dannenberg et al., 2000; Costa, Paramio and Santos, 2013a) así como en otros genes relacionados como p21 (Brugarolas et al., 1998).

## 7. El supresor tumoral p53

p53 es un factor de transcripción codificado por el gen *TP53* que se induce como respuesta al daño celular, hipoxia o activación oncogénica, y que promueve la regulación de un programa de expresión génica complejo que permite la parada del ciclo celular, induce apoptosis o senescencia, o induce ciertos procesos de reparación del ADN (Vousden and Lu, 2002; Wahl and Carr, 2001). Alrededor de un 50% de cánceres humanos presentan mutaciones en *TP53*, lo que refuerza su función como supresor tumoral. No obstante, a diferencia de otros genes supresores de tumores, las alteraciones en *TP53* tienen un carácter dominante debido a que la función es ejercida por tetrámeros de proteína, en los que la mera presencia de un elemento mutado inactiva el complejo. p53 ha sido calificada como guardián del genoma (Lane, 1992): ante daños en el ADN, p53 se induce, e induce a su vez la expresión de proteínas reguladoras como p21, que inhibe a las CDKs, con lo que se produce la parada del ciclo celular. Bajo ciertas circunstancias, por ejemplo daño masivo al genoma, p53 es capaz de inducir apoptosis e impedir a las células su entrada en ciclo en aquellas condiciones que puedan generar o perpetuar daños en el ADN (Harris and Levine, 2005; Oren, 2003). Entre los genes inducidos por p53 y que promueven apoptosis se pueden citar Noxa y Puma, así como Bax, que es un miembro de la familia de proteínas Bcl-2. Algunos estudios en cultivos celulares sugieren que p53 puede inducir apoptosis por mecanismos independientes a la transcripción, por medio de la activación directa de proteínas propapoptóticas o por inactivación de proteínas antiapoptóticas (Chipuk et al., 2004; Marchenko et al., 2000; Mihara et al., 2003).

## 7.1. p53 y el cáncer

Las mutaciones en p53 tienen un efecto muy importante en el desarrollo de cánceres como resultado de la alteración de varios procesos fundamentales: incrementan la capacidad de proliferación celular, disminuyen la apoptosis, aumentan la inestabilidad genética, potencian la angiogénesis y es probable que favorezcan la resistencia a la quimioterapia.

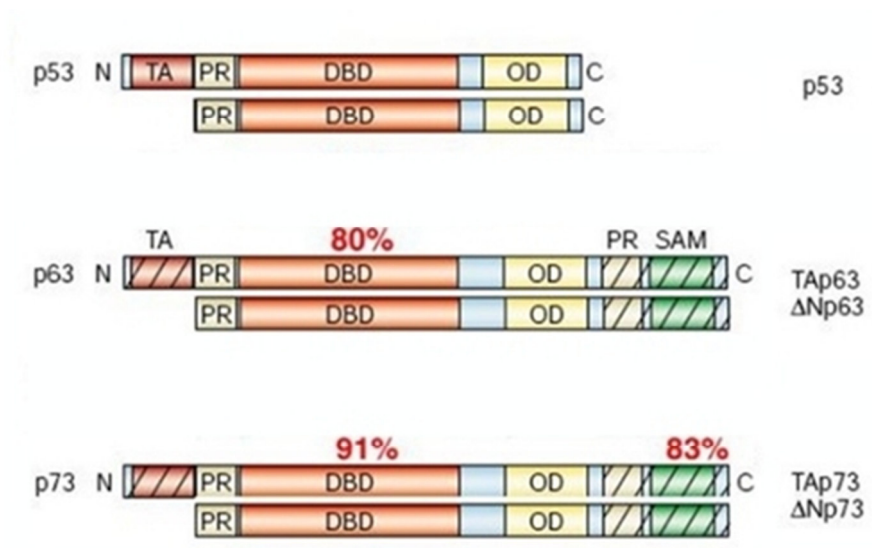
Las mutaciones en p53 están ampliamente involucradas en tumorigénesis humana (Petitjean et al., 2007) y también se asocian con mal pronóstico y alto potencial metastásico en tumores humanos (Petitjean et al., 2007; Toledo and Wahl, 2006).

En los animales deficientes en pRb en epidermis, pese a que no desarrollan tumores espontáneos (Ruiz et al., 2004), la aplicación de tratamientos de carcinogénesis química dan lugar a un menor número de papilomas y de menor tamaño que en animales control (Ruiz et al., 2005) debido a la inducción de p53 que provoca un aumento de apoptosis. Sin embargo, estos papilomas malignizan rápidamente ya que el aumento de expresión y actividad de p53 genera una presión selectiva que conduce a la pérdida prematura de p53, y por lo tanto a un incremento de la conversión maligna (Ruiz et al., 2005; Ruiz, Santos and Paramio, 2006). Además, diversos grupos han relacionado que las mutaciones en *TP53* interfieren con la señalización de TGF $\beta$  e integrinas favoreciendo el desarrollo de metástasis (Muller et al., 2009; Adorno et al., 2009).

Para estudiar el papel del gen *TP53* en el desarrollo tumorigénico se han generado diversos modelos animales deficientes en este gen. La mayoría de los modelos mutantes para p53 son susceptibles en mayor o menor medida a desarrollar tumores espontáneos según el fondo genético del animal, la naturaleza de la mutación, la presencia o no de formas salvajes de p53 o la combinación en el modelo con otros genes asociados a cáncer (Attardi and Donehower, 2005). Los animales homocigotos deficientes en p53 son viables y aparentemente normales, pero desarrollan tumores espontáneos tipo sarcoma o linfoma alrededor de los 6 meses de edad. En el caso de animales heterocigotos la aparición de tumores espontáneos se retrasa hasta aproximadamente 9 meses de edad, lo que indica que la pérdida de un alelo de p53 es suficiente para predisponer al animal al desarrollo de tumores (Donehower et al., 1992). Usando el sistema Cre/LoxP se generó un modelo condicional que permite obtener la delección específica en epidermis del gen *Trp53* mediante cruces con transgénicos K14cre (Byrne et al., 1994). Este modelo desarrolla tumores espontáneos de mama y piel (Jonkers et al., 2001), lo que permite un amplio margen de estudio de las consecuencias fenotípicas resultantes a partir de mutaciones adicionales en genes implicados en progresión tumoral y metástasis.

## 7.2. La familia p53

La familia p53 se compone de tres factores de transcripción; p53, p63, y p73, que han sido ampliamente implicados en la tumorigénesis (fig.3)



**Figura 3. La familia p53.** Existe una gran homología entre los diferentes dominios de p53, p63 y p73, indicados los rojo. (DBD, dominio de unión al ADN; OD, dominio de oligomerización; PR, dominio rico en prolina; SAM, motivo alfa estéril).

p63 y p73 presentan más homología entre ellos que con p53. Ambas proteínas se pueden presentar como dos isoformas según contengan el dominio TAD (dominio de transactivación) completo (isoforma TA) o carezcan de él (isoforma ΔN). En general, se considera que las isoformas TA de p63 y p73 se comportan como p53, mientras que las isoformas ΔN se comportan de forma opuesta.

## 7.3. p63 en el cáncer

p63 pertenece a la familia de p53 y presenta diversas isoformas por el uso de promotores alternativos. Las isoformas principales son TAp63 y ΔNp63. TAp63 puede inducir la detención del ciclo celular y la apoptosis y participar en la respuesta al daño del ADN (Levine et al., 2011; Suh et al., 2006), funciones comúnmente atribuidas a la familia p53. Por otro lado, ΔNp63 es la isoforma predominante en los queratinocitos de la capa basal de la mayoría de los epitelios estratificados y ejercen funciones esenciales en el desarrollo y la diferenciación epitelial (Koster et al., 2007; Mills et al., 1999; Yang et al., 1999).

Al contrario que p53, p63 raramente se encuentra mutado en cánceres humanos, sin embargo, ΔNp63α se encuentra sobreexpresado en algunos de ellos (Higashikawa et al., 2007).

No obstante se ha visto que su expresión se pierde en ciertas áreas invasivas de tumores agresivos sugiriendo que la pérdida de p63 puede acelerar el proceso metastásico (Crum and McKeon, 2010).

Esto concuerda con la capacidad observada de  $\Delta Np63$  de unirse y modular la expresión de múltiples genes, que incluyen factores de transcripción, de adhesión, moléculas de señalización, y múltiples miARNs (Olsen et al., 2013; Testoni et al., 2006; Vigano et al., 2006; Yang et al., 2006).

## 8. Conexión funcional entre la familia de retinoblastoma y p53 en modelos animales.

La familia retinoblastoma, compuesta por pRb, p107 y p130, juega un papel primordial en el control de la proliferación, diferenciación y carcinogénesis en la amplia totalidad de los tejidos adultos. De hecho, la inactivación funcional, pero no genética, de pRb, mediada por complejos ciclina-cdk, es una característica prácticamente universal en todos los tumores humanos. La discrepancia entre ambos eventos, inactivación funcional y genética (mutaciones, LOH, etc) ha llevado a múltiples grupos de investigación a analizar las consecuencias de la pérdida de pRb en modelos animales.

Nuestro grupo describió en 2004 que la ausencia de pRb en epidermis ( $Rb^{ACE}$ ), conduce a hiperplasia e hiperqueratosis moderadas asociadas con un aumento de proliferación y defectos en la diferenciación, aunque sin desarrollo de tumores espontáneos (Ruiz et al., 2004). Resultados posteriores mostraron que dichas alteraciones se producen tanto en condiciones de pérdida crónica (inducida durante el desarrollo embrionario) como de pérdida aguda (en animales adultos) empleando transgenes inducibles de la recombinasa Cre dirigidos a epitelios estratificados ( $Rb^{\Delta Ind}$ ) (Costa et al., 2012; Costa et al., 2013a). Por otra parte, la epidermis deficiente en p107 o p130 no presenta alteraciones, aunque en ausencia de ambos genes, junto a la letalidad perinatal previamente reportada (Mulligan and Jacks, 1998), se producen modificaciones en la diferenciación epidérmica terminal, retraso en el desarrollo de folículos pilosos y dientes, además de un incremento en la proliferación (Ruiz et al., 2003). La realización de experimentos de carcinogénesis química en animales  $Rb^{ACE}$  mostró, por otro lado, un menor número de tumores y más pequeños que los animales control, pero con características más agresivas pasando, en un gran porcentaje, de tumores benignos (papilomas) a carcinomas escamosos (Ruiz et al., 2005). El análisis detallado mediante técnicas bioquímicas y genómicas mostró que la ausencia de pRb conduce a un aumento de la expresión de p53, en parte mediada por el eje E2F1-p19<sup>Arf</sup>. Esto produce una presión selectiva que a su vez conduce a la pérdida prematura de p53 acarreando la malignización de los tumores. De acuerdo con estos datos, la

eliminación simultánea de *Rb1* y E2F1 es suficiente para producir tumores espontáneos en la epidermis de los animales (Costa et al., 2013b). La conclusión de todos estos trabajos fue la existencia de una relación entre pRb y p53 en la supresión tumoral, similar a la encontrada en un gran número de tejidos (Sherr and McCormick, 2002; Tarang et al., 2015). Para confirmar este aspecto, se generó el modelo múrido carente de *Rb1* y *Trp53* en epidermis (Martinez-Cruz et al., 2008) donde el desarrollo tumoral espontáneo debido a la pérdida epidérmica de p53 (Jonkers et al., 2001) se veía fuertemente acelerado por la pérdida simultánea de ambos genes (Martinez-Cruz et al., 2008). Datos posteriores apuntan a que diferentes genes de la vía de p53 son efectores de esta interrelación. Así, los animales carentes de pRb y p21 desarrollaron un fenotipo caracterizado con fuertes alteraciones en la proliferación y diferenciación, inflamación, respuesta alterada al daño en el ADN y desarrollo de tumores espontáneos (Saiz-Ladera et al., 2014).

Por otro lado, la discrepancia entre inactivación funcional y genética que afecta a pRb en tumores humanos, podría ser justificable si, en ausencia de pRb, otros miembros de la familia (p107 o p130), y que también son dianas de la inactivación funcional mediada por ciclinas-cdk, pudieran ejercer parte de las funciones de pRb en su ausencia. De acuerdo con esta hipótesis, la eliminación de pRb en la epidermis de animales carentes de p107 agrava de forma dramática el fenotipo epidérmico consecuencia de la pérdida de pRb, produciendo un incremento masivo de la proliferación, diferenciación aberrante y la muerte de los animales alrededor del día 10 tras el nacimiento (Ruiz et al., 2004). Por el contrario, la pérdida de p130 no agrava el fenotipo producido por la ablación de pRb en piel, aunque los análisis de transcriptómica mostraron la expresión alterada de múltiples genes que pueden justificar dicha ausencia de fenotipo y que son controlados por los factores de transcripción E2F1 y E2F4 (Lara et al., 2008a).

Para evitar los problemas asociados a la letalidad prematura de los animales  $Rb^{ACE};p107^{-/-}$  se analizaron trasplantes de piel y queratinocitos primarios que fueron infectados con retrovirus codificantes para HaRas activado (Lara et al., 2008b). En ambos casos se observó que la ausencia de p107 y pRb confería una mayor susceptibilidad a la transformación neoplásica tanto espontánea (trasplantes) como mediada por Ras (queratinocitos primarios), y que se producía por una interferencia en la señalización que conduce a la activación de p53 (Lara et al., 2008b). Más recientemente estos datos se han confirmado mediante la delección aguda de pRb en animales adultos deficientes para p107 (Costa et al., 2012) mediante el empleo de construcciones Cre inducibles por tamoxifeno. Estos animales sobreviven aproximadamente 5 meses tras el tratamiento con tamoxifeno, mostrando invariablemente lesiones pretumorales y tumorales espontáneas principalmente en zonas del hocico y párpados asociadas a la pérdida parcial de la activación de p53 que conduce a la reducción de los niveles de expresión del supresor *Pten* y a la activación del eje Akt/mTOR (Costa et al., 2012).

Finalmente, nuestro grupo acaba de mostrar que la inactivación de los tres miembros de la familia retinoblastoma en tejido urotelial  $Rb^{F/F};p130^{F/F};p107^{-/-}$ , mediado por la inoculación intravesical de un adenovirus que codifica para Cre, es suficiente para producir tumores superficiales similares a los encontrados en pacientes humanos (Santos et al., 2014). No obstante, estos tumores no parecen progresar a estadios avanzados debido en parte a la activación de p53 y la no ejecución del programa de TEM (Martinez Fernández et al., 2015 [Oncogene, enviado]).

## 9. Los microARNs

Los microARNs son pequeños ARNs de aproximadamente 20-25 nucleótidos no codificantes que regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional. Actúan como represores de la expresión de mRNAs diana inhibiendo su traducción o promoviendo su degradación.

Se han identificado más de 2000 microARNs en el genoma humano (McGuire et al., 2015) que se estima que regulan unos 5300 genes (Shenouda and Alahari, 2009). De ahí que los microARNs sean considerados como el mayor tipo de reguladores de la expresión génica. Además cada microARN puede regular múltiples genes, lo que subraya la influencia potencial de estos en distintos procesos biológicos (Esquela-Kerscher and Slack, 2006).

En la piel se expresan más de 100 microARNs (Yi et al., 2006). En este contexto, determinados microARNs juegan un papel funcional de gran importancia en el desarrollo de la epidermis y el folículo piloso de ratón.

Por lo tanto, la desregulación de microARNs está vinculada a diversas patologías humanas que incluyen el cáncer y su expresión se asocia con el desarrollo, la progresión y el pronóstico del cáncer debido a su implicación en la proliferación celular, apoptosis, angiogénesis y metástasis (Di Leva et al., 2013).

### 9.1. Implicación de los microARNs en TEM y metástasis.

Los microARNs están implicados en multitud de procesos fisiológicos y alteraciones en su expresión pueden ser causa de diversas patologías, entre ellas el cáncer. En este sentido, si actúan sobre oncogenes se pueden considerar supresores tumorales, mientras que si actúan sobre genes supresores, su papel puede ser oncogénico. Por otro lado, un mismo microARN puede ejercer un papel oncogénico o supresor tumoral dependiendo del contexto en el que se exprese (tejido-específico) debido a la expresión selectiva de sus dianas.

Diversos estudios han relacionado el supresor tumoral p53 con la desregulación de microARNs (He et al., 2007; He et al., 2007b). Además, los microARNs se han asociado con los procesos de TEM y metástasis (Wang et al., 2010).

La familia miR200 formada por miR200a, miR200b, miR200c, miR429 y miR141, además, inhibe los procesos de transición epitelio-mesénquima por inhibición de los represores transcripcionales ZEB1 Y ZEB2 (Korpál et al., 2008). Asimismo, la familia miR34 parece ser inducida por p53 y está implicada en el bloqueo del ciclo celular y en la apoptosis.

El microARN miR205 se asocia con características epiteliales y fenotipo diferenciado asociándose su pérdida con cánceres invasivos y de mal pronóstico (Greene et al., 2010) y miR203 regula negativamente p63 afectando a la funcionalidad de las células madre epidérmicas (Lena et al., 2008; Yi et al., 2008).

Por su parte, el microARN miR21 ha sido ampliamente descrito como uno de los microARNs altamente sobreexpresados en tumores sólidos de distinta naturaleza como glioblastoma o mama (Ma et al., 2008a). Además, miR21 está implicado en la regulación de la homeostasis epidérmica (Zavadil et al., 2007) y en procesos de transición epitelio-mesénquima vía TGF- $\beta$  (Papagiannakopoulos et al., 2008; Zavadil et al., 2007).





*Objetivos*



# Objetivos

---

Los modelos *Trp53*<sup>ΔEC</sup> y *Rb*<sup>ΔEC</sup>;*Trp53*<sup>ΔEC</sup> desarrollados anteriormente en nuestro laboratorio mostraron un desarrollo tumoral espontáneo con una alta incidencia de metástasis pulmonar y un claro paralelismo con diversos cánceres humanos con mutaciones en el gen *TP53* y asociados con mal pronóstico clínico. En previsión de que estos modelos puedan ser una excelente herramienta para la evaluación preclínica de diferentes agentes terapéuticos, en este trabajo nos hemos propuesto aportar nuevos conocimientos sobre los mecanismos moleculares que subyacen al desarrollo tumoral y metástasis en estos modelos animales. Para ello hemos propuesto los siguientes objetivos:

1. Conocer el papel de los microARNs (y en particular miR21) en el desarrollo tumoral y su potencial metastásico así como identificar las rutas implicadas en la expresión desregulada de estos microARNs.
2. Estudiar el papel de p63 en el proceso de metástasis en ausencia de p53.

Por otro lado, dado que nuestros datos previos en modelos animales deficientes en uno o varios miembros de la familia de retinoblastoma han relacionado esta familia con el supresor tumoral p53 nos hemos propuesto el siguiente objetivo:

3. Generación y caracterización de un modelo inducible *Rb*<sup>Δind</sup>;*p107*<sup>-/-</sup>;*p130*<sup>Δind</sup> deficiente para los tres miembros de la familia retinoblastoma *Rb1*, *Rbl1* y *Rbl2* en epitelios estratificados.



## *Materiales y Métodos*



# Materiales y métodos

## Animales de experimentación

### 1. Líneas de animales transgénicos

Durante el desarrollo de esta tesis se han utilizado ratones deficientes en p53:  $Trp53^{\Delta CE}$  (Jonkers, 2001) y  $Rb^{\Delta CE};Trp53^{\Delta CE}$  (Martinez-Cruz et al., 2008) y animales deficientes en la familia retinoblastoma  $Rb1^{F/F};Rb12^{F/F};Rb1^{-/-};K14cre^{ERT2}$ . Para los ensayos de tumorigénesis *in vivo* se utilizaron hembras  $Foxn1^{nu}$  (ratones desnudos o *nu/nu*) de 5 semanas de edad (Charles River). Estos ratones presentan mutaciones en el gen *FoxN1* que impiden el correcto desarrollo de las células del timo así como de los folículos pilosos (Pelleitier and Montplaisir, 1975).

#### 1.1. Establecimiento de la línea de animales $Rb1^{F/F};Rb12^{F/F};Rb1^{-/-};K14cre^{ERT2}$ (TKO)

Los animales  $Rb1^{F/F};Rb12^{F/F};Rb1^{-/-};K14cre^{ERT2}$  proceden de cruces entre animales  $Rb^{F/F};p107^{-/-};p130^{F/F}$  Rosa26 en un fondo mixto, cedidos por el Dr. Julien Sage (Stanford University Medical Center), con la línea  $Rb^{F19/F19};p107^{-/-};K14cre$  en un fondo FVB desarrollada en nuestro laboratorio (Costa et al, 2012) y por lo tanto expresan la recombinasa Cre de forma inducible por Tamoxifeno bajo el promotor de la queratina K14.

#### 1.2. Mantenimiento de líneas de animales transgénicos

Los animales se han mantenido en un animalario con ciclos de 12 horas luz/12 horas oscuridad a una temperatura de  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y  $55 \pm 10\%$  de humedad relativa y han sido alimentados *ad libitum* con pienso Teklad Global diet 2014 (HARLAN Laboratories, Santa Perpetua de la Mogoda, Barcelona) y agua.

Cumpliendo los criterios exigidos por el OEBA del CIEMAT y las recomendaciones de FELASA, los animales se sacrificaron en atmósfera de  $\text{CO}_2$  cuando el animal mostraba deterioro debido a los distintos tratamientos o debido al crecimiento tumoral.

## 2. Extracción de ADN genómico

Para el aislamiento de ADN genómico se ha utilizado el extremo final de la cola de animales de 8-12 días de edad.

La extracción de ADN genómico se ha realizado según el protocolo descrito por Peter W. Laird (Laird et al., 1991): se digirió el tejido en 700 µl de buffer de lisis (100 mM Tris-HCl pH: 8,5; 5 mM EDTA; 0,2% SDS; 200 mM NaCl; 100 µg/ml proteinasa K) a 55°C en agitación durante al menos 6 horas. Una vez digerida la cola se precipitó el ADN con isopropanol (en proporción 1:1) y se lavó con etanol 70% para eliminar las sales residuales. Una vez seco, se resuspendió el ADN genómico en 500 µl de buffer TE (10 mM Tris HCl pH 7,5; 1 mM EDTA pH: 8).

## 3. Genotipado de los animales

El genotipado de los animales se realizó a partir de 1 µl del ADN genómico extraído, por PCR mediante la siguiente reacción: *GoTaq Hot Start Master Mix* 1x (Promega), oligonucleótidos 0,5 µM y H<sub>2</sub>O hasta un volumen total de reacción de 10 µL.

- Animales deficientes en p53

El programa de reacción utilizado fue el siguiente:

- 5 minutos 94°C
  - 30 segundos 94°C
  - 30 segundos 58°C
  - 50 segundos 72°C
  - 10 minutos 72°C
  - ∞ 4°C
- } 29 ciclos

Los oligonucleótidos utilizados en el genotipado de estos animales fueron los siguientes:

Gen	Oligonucleótido	Secuencia (5' -> 3')	Fragmento amplificado	Tamaño de banda (pb)
Rb	Rb 18	GGCGTGTGCCATCAATG	Alelo Rb wt	680
	Rb 19	AACTCAAGGGAGACCTG	Alelo Rb floxado	748
p53	p53 10R	GAAGACAGAAAAGGGGAGGG	Alelo p53 wt	431
	p53 10F	AAGGGGTATGAGGGACAAGG	Alelo p53 floxado	584
Cre	Cre 1	CGATGCAACGAGTGATGAGGTTC	Alelo Cre (cre1 + cre2)	400
	Cre 2	GCACGTTCCCGGCATCAAC		

- Animales TKO



El programa utilizado fue el siguiente:

- 3 minutos 94°C
  - 30 segundos 94°C
  - 1 minuto 55°C
  - 1 minuto 72°C
  - 5 minutos 72°C
  - ∞ 4°C
- } 31 ciclos

Los oligonucleótidos utilizados en el genotipado de estos animales fueron los siguientes:

Gen	Oligonucleótido	Secuencia (5' -> 3')	Tamaño de banda (pb)
Rb	Rb18	GGCGTGTGCCATCAATG	680 pb
			748 pb
	Rb19	AACTCAAGGGAGACCTG	300 pb*
p107	p107 F	TCGTGAGCGCGGATAGAAAGG	280 pb
	p107 R	CTGCCGAAGGTAATAACGGAC	
	p107 LZ1	CGTCACACTACGTCTGAACG	560 pb
	p107 LZ2	CGACCAGATGATCACACTCG	
creER	IL2-1 (0042)	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT	324 pb
	IL2-2 (0043)	GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC	
	CreEsr-1 (3797)	ATACCGGAGATCATGCAAGC	440 pb
	CreEsr-2 (3798)	AGGTGGACCTGATCATGGAG	
p130	p130 lox Δ3	CGGAGGCTAAGAGCATTGTG	300-400 pb
	p130 5'lox	GTGTTGTAACATTCTCGTGGG	

\* Tamaño del fragmento deleciónado.

Los productos de PCR se resolvieron en geles al 1,8% de agarosa en TBE 1X (89 mM Tris-borato; 2 mM EDTA; pH 8) con 1 µg/mL de bromuro de etidio (Sigma). En todos los casos se incluyó un pocillo con un marcador de bajo peso molecular (IX, Roche). A los geles se les aplicó una corriente de 100 V durante 30-45 minutos. La visualización de los geles se realizó en un transiluminador de luz ultravioleta (Bio-Rad Laboratories) y el uso del programa informático Quantity One (Bio-Rad Laboratories).

## 4. Aplicación tópica de tamoxifeno para inducir recombinación en epidermis de ratones TKO.

Se administraron diferentes dosis de tamoxifeno T5648 (Sigma) en periodos de 1 a 5 días con el fin de ajustar la dosis garantizando la supervivencia del animal y disminuir el efecto tóxico del tamoxifeno.

Las dosis aplicadas fueron desde 25 mg (Costa et al, 2012) a 1 mg (Kataoka et al., 2008).

Los tratamientos se realizaron entre la séptima y la duodécima semana de vida de los animales, momento que corresponde al segundo telogen del pelo.

En el momento de la aplicación los animales fueron anestesiados con isoflurano (Isoflo, Lab Dr Esteve) utilizando un equipo de anestesia inhalatoria. Se afeitó una porción del lomo del animal de unos 2 cm<sup>2</sup> donde, para facilitar la absorción del tamoxifeno, se pegó y despegó varias veces cinta de celo, y después se aplicó el tratamiento en la zona afeitada.

A partir de ese momento se realizó un seguimiento del estado del animal hasta el momento de su sacrificio.

## 5. Incorporación de BrdU in vivo

Previo al sacrificio de los animales (aproximadamente 1 hora antes) se les inyectó por vía intraperitoneal 0,1 mg por gramo de peso del animal de una solución de bromodeoxiuridina (Roche) a una concentración de 10 mg/ml de NaCl al 0,9%.

## 6. Toma de muestras

Los animales se sacrificaron por inhalación de CO<sub>2</sub>. Las muestras recogidas se fijaron en formol 4% en PBS o en etanol al 70%.

Las muestras fijadas en formol, tras 24 horas se lavaron con agua y se pasaron por concentraciones crecientes de etanol hasta 70% y posteriormente se incluyeron en parafina.

En paralelo se incluyeron muestras en resina (OCT Tissue-Tek, Sakura) que proporciona una matriz adecuada para realizar secciones (8 µm de espesor) en condiciones de congelación en criostato (Leica).

Por otro lado se congelaron muestras de tejido en nitrógeno líquido que se almacenaron a -80°C para utilizar en análisis bioquímicos.

Por último, se conservaron muestras en RNA later (Ambion) para impedir la degradación del ARN antes de su extracción. Las muestras se mantuvieron de 16 a 24 horas a 4°C y se almacenaron a -20°C.

## 7. Ensayos de tumorigénesis *in vivo*

La metodología en este ensayo consiste en inyectar subcutáneamente en flanco de ratón un número de células y hacer un seguimiento del crecimiento tumoral. Se emplearon células tumorales 940T (véase más abajo), derivadas de un tumor de ratón *Rb*<sup>ΔCE</sup>; *Trp53*<sup>ΔCE</sup>. Las células fueron tripsinizadas y resuspendidas en PBS a razón de  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$  células por 100 μl de PBS siendo este volumen inyectado por vía subcutánea en cada flanco del ratón. Los ratones inyectados con  $1 \times 10^6$  células presentaron un desarrollo tumoral muy rápido por lo que se fijó en  $1 \times 10^5$  células el número de células inyectadas para la realización de implantes subcutáneos. Este procedimiento se realizó con las siguientes líneas celulares: 940T, 940miR-ZIP-Vec, 940miR-ZIP-21, 940GFP, 940ΔNp63α, PBmiRVec y PBmiR21.

Tras la inyección subcutánea de las células, se controló el momento de aparición y el crecimiento de los tumores durante el periodo establecido de un mes teniendo en cuenta los criterios de punto final establecidos por el CCAC (Canadian Council on Animal Care) momento en que se sacrificó por inhalación de CO<sub>2</sub> y se extirparon los tumores y los pulmones, muestras que fueron procesadas como se describe más adelante.

## 8. Extirpación de tumores *in vivo*

En un abordaje experimental se procedió a la extirpación quirúrgica de los tumores subcutáneos (resección completa) un mes después de la inyección de células.

En animales anestesiados con 5 μl/g de ketamina 10 mg/ml + medetomidina 0.1 mg/ml (Ketolar, Pfizer Parke-Davis SL, Alcobendas, Madrid y Dexdormitor, Laboratorios Dr. Esteve SA, Barcelona respectivamente), se extrajeron los tumores y se cosió la piel con sutura de seda trenzada no absorbible de grosor 5-0 de punta roma (Ethicon®) y sobre la cicatriz se aplicó pegamento cutáneo. Finalizada la intervención, se revirtió la anestesia con 5 μl/g de atipamezol 0.5 mg/ml (Antisedan, Lab. Dr Esteve SA, Barcelona).

Un mes más tarde se sacrificó al animal. Todas las muestras (tumores y pulmones) se procesaron como se describe más adelante.

## 9. Ensayos de desarrollo de metástasis

Esta técnica consiste en la inyección en vena de cola de las células de estudio en ratones atímicos. En este caso el número de células inyectadas se fijó en  $10^4$ . Tras la inyección de las células se controló el estado de los animales y un mes después se sacrificaron y se extirparon los pulmones para su posterior estudio.

### Cultivos celulares

## 10. Líneas tumorales

### 10.1. Generación y mantenimiento

Las líneas de células tumorales se aislaron y establecieron a partir de tumores de animales deficientes en p53 en epitelios estratificados (*Trp53<sup>ΔCE</sup>* y *Rb<sup>ΔCE</sup>;Trp53<sup>ΔCE</sup>*).

Una vez extraídos los tumores se realizó una disgregación mecánica y después una disgregación química con tripsina (GIBCO) al 0,25% 20 minutos a 37°C. Las células se cultivaron en medio de plaqueo (EMEM + 4% de suero quelado + 1% antibiótico antimicótico + 0.04% CaCl<sub>2</sub>) durante toda la noche para favorecer al adhesión de estos a la placa y después se cambió el medio a un medio de crecimiento (EMEM + 4% de suero quelado + 1% antibiótico antimicótico + 0.01% CaCl<sub>2</sub> + 0.001% EGF).

Cuando la confluencia era del 80% las células se trataron con tripsina EDTA al 0.05% durante 3-4 minutos a 37°C y se pasaron a nuevas placas con medio de plaqueo. Tras un mínimo de 3 horas se cambiaron a medio de crecimiento. El cultivo se mantuvo a 37°C en atmósfera con un 95% humedad y 5% de CO<sub>2</sub>.

La línea 940T, establecida como se ha descrito, se empleó para realizar los diferentes estudios descritos en este trabajo.

### 10.2. Tratamientos con drogas

Se realizaron distintos tratamientos farmacológicos para los que se suministró la droga de estudio al medio de crecimiento de las células 940T o al medio CNT7 de las células CoCa. Pasado el tiempo requerido de tratamiento se evaluaron los efectos. Como control se utilizaron las células cultivadas añadiendo al medio el vehículo en el cual estaban disueltas las drogas.

Las drogas utilizadas en los diferentes tratamientos se enumeran en la siguiente tabla:

NOMBRE	DILUCIÓN	TIEMPO TRATAMIENTO	CASA COMERCIAL
5-Azacitidina	25 $\mu$ M	24 horas	SIGMA-ALDRICH
DAPT	25 $\mu$ M	24 horas	SIGMA-ALDRICH
MG132	5 $\mu$ M	24 horas	Santa Cruz
Rapamicina	10 nM	24 horas	LC Laboratories
	50 nM	48 horas	
SB431542	5 $\mu$ M	24 horas	SIGMA-ALDRICH
Tirfostina	100 $\mu$ M	48 horas	LC Laboratories

### 10.3. Transfección de antimir miR-ZIP-21 en la línea tumoral 940T

La transfección en 940T se realizó estando las células en estado de preconfluencia en placas de 10 cm de diámetro. Para la transfección se utilizó el reactivo FuGENE<sup>®</sup> HD (Promega). Siguiendo el protocolo recomendado se prepararon 14  $\mu$ g/placa de plásmido portador del miR-ZIP-21 (System Bioscience) y se añadió agua estéril y medio DMEM sin complementar hasta obtener una concentración final de 0,02  $\mu$ g/  $\mu$ l.

Se añadieron 4  $\mu$ l de FuGENE HD por cada  $\mu$ g de ADN y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente para finalmente incorporar la mezcla al medio de cada placa. Se incubó durante 48 horas a 37°C en atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>. Del mismo modo se realizó la transfección de un vector vacío miR-ZIP-VEC como control.

Las células transfectadas con miR-ZIP-21 se cultivaron en medio de plaqueo y crecimiento de igual manera que las células tumorales, con un suplemento de puomicina en una concentración de 7,5  $\mu$ g/ml para seleccionar las células que habían incorporado correctamente el plásmido con el antimiR.

### 10.4. Generación de la línea celular 940 $\Delta$ Np63 $\alpha$

La secuencia que codifica para el gen humano  $\Delta$ Np63 se obtuvo mediante la digestión del vector  $\Delta$ Np63alpha-FLAG (*Addgene*) con las enzimas de restricción XbaI/XhoI y se insertó en los sitios NheI/XhoI del vector lentiviral pL105iGFP (proporcionado por el Dr. R. Murillas).

#### 10.4.1. Producción de vectores lentivirales por transfección transitoria de células 293T

La línea celular humana embrionaria de riñón 293T altamente transfectable se empleó para la producción de sobrenadantes virales de tercera generación (Dull et al., 1998) sembramos células 293T en placas de cultivo celular de 10 cm de diámetro. Cuando los cultivos alcanzaron el 70% de confluencia, transfectamos las células empleando polietilenimina (PEI) (Polyethylenimine “Max”, (Mw 40,000), Polysciences, Inc.)

Producción de vectores lentivirales de tercera generación		
Plásmido		ADN µg/p100 mm
Transfer		8,4 µg
Envuelta	pMD2.VSVG	2,8 µg
Helper	prsv Rev	2,8 µg
Helper	pMDLg pRRE	2,8 µg

#### 10.4.2. Recogida de sobrenadantes infectivos

Recogimos el sobrenadante de los cultivos transfectados tras 24h y repusimos el medio para volver a recogerlo 48h tras la transfección. Eliminamos los restos celulares filtrando el medio a través de membranas con un tamaño de poro de 0.45 µm (Millipore). Centrifugamos los sobrenadantes 2h a 25000 g en una ultracentrífuga refrigerada a 4°C Avanti J-30I (Beckman Coulter), en un rotor JS-24 (Beckman Coulter). Tras la centrifugación, desechamos el sobrenadante y resuspendimos el precipitado en hielo en PBS estéril.

#### 10.4.3. Infección de células 940T

Se utilizaron placas de cultivo de células 940T a baja densidad para favorecer la eficiencia de infección. Se añadió el sobrenadante viral y se mantuvieron durante 8 horas con este sobrenadante que después se sustituyó por medio de crecimiento. Al día siguiente se realizó una reinfección con el segundo sobrenadante lentiviral. Nuevamente se mantuvieron las células durante 8 horas tras lo que se retiró el sobrenadante y se suplió por medio de crecimiento.

La eficacia de la infección fue determinada cualitativamente con microscopio de fluorescencia invertido y cuantitativamente por un separador celular (BD Influx™ cell sorter) seleccionando las células que expresaban la proteína verde fluorescente GFP.

Las células seleccionadas por el separador se aislaron, amplificaron y se mantuvieron en cultivo para estudios posteriores.

## 11. Otras líneas celulares

### 11.1. Línea celular CoCa

La línea celular de queratinocitos de ratón CoCa desarrollada en nuestro laboratorio (Segrelles et al, 2011) posee características propias de células epiteliales por lo que la hemos utilizado como células control frente a las líneas de células tumorales.

### 11.2. Línea celular HaCat

HaCat es una línea celular de queratinocitos humanos no transformados utilizada en investigación como modelo de queratinocitos debido a su capacidad de diferenciación altamente conservada (Schoop et al, 1999).

### 11.3. Línea celular PB

Las células PB son células de ratón derivadas de un papiloma de piel químicamente inducido (Yuspa et al, 1986).

#### 11.3.1. Tranfecciones en las células PB

Las células PB se transfectaron mediante fosfato cálcico siguiendo las indicaciones del protocolo de Sambrook (Sambrook, 1989).

Los plásmidos transfectados se describen a continuación.

Plásmido	Procedencia	Resistencia/concentración	Casa comercial
<b>miRVEC</b>	Source BioScience	blastidina (50µg/ml)	Blasticidin S HCl sc-204655
<b>miR21</b>	Source BioScience	blastidina (50µg/ml)	
<b>Snail</b>	Cedido por la Dra. Amparo Cano	G418 (1mg/ml)	Calbiochem®
<b>miR21+snail</b>		blastidina (50µg/ml) + G418 (1mg/ml)	

## 11.4. Línea celular 293T

Estas células son una línea celular humana embrionaria de riñón inmortalizada y optimizada para ser transfectadas transitoriamente y dar a niveles altos de expresión de proteínas, lo que las hace idóneas para ser utilizadas como células empaquetadoras

## 11.5. Mantenimiento de los cultivos

Las células CoCa se cultivaron en medio de plaqueo (EMEM + 4% de suero quelado + 1% antibiótico antimicótico + 0,04% CaCl<sub>2</sub>) durante 8-12 horas para favorecer su adhesión a la placa, y después un medio definido, CnT-7 (CELLnTEC, Bern, Switzerland) para favorecer su crecimiento.

Las células PB se siembran en monocapa en medio completo DMEM-Glutamax (GIBCO), 10% de suero fetal bovino inactivado (SFBi) (BioWhitaker) y 1% de antibiótico antimicótico (GIBCO) y el antibiótico correspondiente. En el caso de las células HaCat transfectadas (HaCat-miRvec y miR21) se mantienen en el mismo medio suplementado con 8 µg/µl de blasticidina

Las células 293T se siembran en DMEM (Gibco Life Technologies) suplementado con 10% HyClone (Thermo Scientific) y 0.5% Antibiótico (penicillin/streptomycin, Gibco Life Technologies)

Los cultivos se mantuvieron en todo momento en condiciones de 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad relativa.

## 12. Criopreservación de las células

Para preservar las células se congelaron en nitrógeno líquido suspendidas en un medio de congelación compuesto por SFB (75%) y dimetil sulfóxido (10%) en medio EMEM (15%) (GIBCO) y D-glucosa.

## 13. Estudios de migración/invasión

Para evaluar la capacidad invasiva de las células *in vitro* se utilizó el producto *BD Biocoat™ Matrigel™ Invasion Chamber* (BD Biosciences) consistente en dos placas con una membrana con poros de 8 µm de tamaño y una de ellas además con una matriz de Matrigel que hace la función de membrana basal *in vitro*. La capa de Matrigel bloquea los poros impidiendo que las



células no invasivas migren a través de la membrana. Por el contrario, las células con capacidad invasiva son capaces de invadir a través de la matriz de Matrigel.

En cada pocillo se sembraron  $5 \times 10^4$  células de estudio y se realizó el cultivo siguiendo las indicaciones del fabricante.

La tinción de las células se realizó según el protocolo por fijación de metanol y tinción con toluidina y la medida de la invasión celular a través de las siguientes fórmulas:

a.) Determinación de la migración:

$$\text{promedio de células que migran} = \frac{\text{número de células que migran a través de los insertos (por campo)}}{\text{número de campos}}$$

b.) Determinación del porcentaje de invasión:

$$\% \text{ invasión} = \frac{\text{media de células invasoras a través de los insertos con matrigel}}{\text{media de células que migran a través de los insertos sin matrigel}} \times 100$$

c.) Determinación del índice de invasión:

$$\text{Índice de invasión} = \frac{\% \text{ invasión de las células a testar}}{\% \text{ invasión de las células control}}$$

## *Estudio del material biológico*

### 14. Análisis histológico y técnicas de inmunodetección

Las muestras histológicas fijadas en etanol o formol fueron embebidas en parafina. Los cortes histológicos (5  $\mu\text{m}$  de grosor) se realizaron con microtomo, se desparafinaron y tiñeron con hematoxilina/eosina para realizar el análisis histológico inicial.

Para la detección de antígenos específicos mediante inmunohistoquímica o inmunofluorescencia se siguió el siguiente protocolo: los cortes desparafinados se incubaron, inicialmente en suero de caballo al 10% en PBS durante 30 minutos a 37°C para impedir uniones inespecíficas, y posteriormente con los anticuerpos primarios diluidos en BSA al 1% en PBS durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos secundarios se incubaron una hora a temperatura ambiente diluidos en BSA al 1% en PBS. Entre las distintas incubaciones se realizaron varios lavados con PBS y PBS-Tween 0,05%.

Las muestras fijadas en formol, después del desparafinado, se trataron en microondas con tampón citrato 10 mM pH=6,0 para desenmascarar los epítomos.

En el caso de detección de incorporación de BrdU, se hizo un tratamiento, tras la desparafinación, con HCl 2N durante una hora con el fin de favorecer la desnaturalización del ADN seguido de lavados exhaustivos con PBS pH7.0.

Para la tinción inmunohistoquímica se añadió un tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% en metanol durante 10 minutos a temperatura ambiente, previo a la incubación con suero de caballo, para inhibir la actividad de las peroxidasas endógenas.

Para la detección del anticuerpo secundario se utilizó el sistema avidina/estreptavidina-peroxidasa (ABC Kit, Vectastain) según las indicaciones de la casa comercial. La reacción se visualizó añadiendo diaminobencidina como sustrato cromógeno y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Peroxidase Substrate Kit DAB, Vector Laboratories). Las preparaciones se contratiñeron con hematoxilina y se montaron en un montador de cubreportas (Leica CV5030). La visualización se realizó en microscopio óptico convencional y la captura de imágenes se realizó con la cámara Olympus DP21.

Las muestras fijadas en formol y utilizadas para inmunofluorescencia fueron incubadas con NH<sub>4</sub>Cl 100 mM durante 30 minutos a temperatura ambiente (después de haber sido desparafinadas) para el bloqueo de la autofluorescencia debida a los restos de formol.

En el caso de las inmunofluorescencias, se emplearon anticuerpos secundarios unidos a fluorocromos y el montaje se realizó utilizando Moviol (Hoescht). En las muestras donde se quisieron identificar los núcleos, se añadió DAPI (10 µg/µl) (Roche) al moviol. La visualización de la tinción se realizó en un microscopio de fluorescencia (Zeiss Axioplan2 imaging) y las imágenes fueron capturadas por una cámara digital (AxioCam MRm) y visualizadas por el programa AxioVision 4.

El procesamiento de las imágenes se realizó mediante los programas Corel DRAW 11 y Adobe Photoshop CS2.

## 14.1. Anticuerpos

Los anticuerpos empleados en las diferentes tinciones se enumeran en la siguiente tabla:

ANTICUERPOS PRIMARIOS			
ESPECIFICIDAD	ORIGEN	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL
Anti-pan citoqueratina	Monoclonal de Ratón	1:500	Abcam
K5	Policlonal de Conejo	1:500	Covance
K6	Policlonal de Conejo	1:1000	Covance
K8	Monoclonal de Rata	1:1	DSHB
K10	Monoclonal de Ratón	1:50	Dako cytomation
K14	Monoclonal de Ratón	1:100	Abcam
Filagrina	Policlonal de Conejo	1:1000	Covance
Loricrina	Policlonal de Conejo	1:1000	Covance
E-cadherina	Monoclonal de Ratón	1:500	Transduction Lab
Vimentina	Monoclonal de Ratón	1:10	Abcam
p63	Monoclonal de Ratón	1:50	Santa Cruz
BrdU	Monoclonal de Ratón	1:50	Roche
Akt-P (ser473)	Policlonal de Conejo	1:100	Cell Signaling

Erk-P	Monoclonal de Ratón	1:250	Santa Cruz
S6-P (S235/236)	Policlonal de Conejo	1:100	Cell Signaling
Snail	Policlonal de Conejo	1:250	Santa Cruz
ANTICUERPOS SECUNDARIOS			
ESPECIFICIDAD	CONJUGADO	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL
Ratón	Biotina	1:1000	Jackson
	Texas Red	1:500	Jackson
	FITC	1:50	Jackson
Conejo	Biotina	1:1000	Jackson
	Texas Red	1:500	Jackson
	FITC	1:50	Jackson
Rata	Texas Red	1:1000	Molecular Probes

## 15. Extracción de proteínas y análisis por inmunoblot

Para la obtención de proteínas, las células al 80% de confluencia se levantaron de la placa de cultivo raspando con raspador. Posteriormente los lisados se lavaron con PBS y se centrifugaron a 2000 rpm y 4°C durante 10 minutos para retirar el PBS seguido de al menos tres ciclos de congelación-descongelación (nitrógeno líquido/baño a 37°C) en un tampón de lisis compuesto por Hepes 200 mM pH7.9, glicerol 25%, NaCl 0.4M, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM y NP-40 (Roche) 1%; suplementado con los inhibidores de fosfatasa (PhosSTOP EASYpack, Roche) y de proteasas (cOmplete Mini, EDTA-free, Roche). El material obtenido se centrifugó a 13000 rpm y 4°C durante 10 minutos. Se recogió el sobrenadante para cuantificar la concentración de proteína mediante análisis colorimétrico de Bradford (BioRad) usando una curva estándar de rango 1.25 µg/µl-20 µg/µl de BSA.

Las proteínas obtenidas en los extractos se separaron en geles de SDS-PAGE 4-12% (Invitrogen) utilizando entre 20-40 µg de proteína de cada muestra, mezclados con tampón de carga y agente reductor (Invitrogen). La electroforesis se hizo en el tampón de electrodo MES (Invitrogen) para la separación de proteínas de pequeño-medio tamaño. Los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Invitrogen) en cámara húmeda Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad) con tampón de transferencia estándar (Trizma-Base 25 mM, glicina 190 mM y metanol 10%). La membrana se tiñó con solución PONCEAU (Sigma) para la rápida visualización de las bandas de proteínas. Tras varios lavados con PBS, se incubó la membrana con una solución de bloqueo a base de BSA (Sigma-Aldrich) 5% en TBS-Tween20 1% durante al menos 30 minutos para bloquear las uniones inespecíficas. Tras ello, se incubó con los correspondientes anticuerpos primarios diluidos en BSA 2,5% en TBS-Tween20 1% dirigidos frente a las proteínas de interés.

Para detectar la unión del anticuerpo primario se usan anticuerpos secundarios unidos a peroxidasa y se visualizan las bandas correspondientes mediante el kit de detección de

luminiscencia que se basa en una reacción específica de peroxidasa (*Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate*, Pierce)

Para incubar una misma membrana con sucesivos anticuerpos primarios, se eliminaron cada vez los anticuerpos unidos sumergiendo la membrana en tampón de “stripping” (62,5 mM Tris-HCl pH 6,7, 2% SDS, 100 mM β-mercaptoetanol) durante 30 minutos a 50°C y lavando al menos tres veces con PBS antes de empezar una nueva inmunodetección.

Los anticuerpos empleados en los análisis por western blot se enumeran en la siguiente tabla:

ANTICUERPOS PRIMARIOS			
ESPECIFICIDAD	ORIGEN	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL
<b>Akt</b>	Policlonal de cabra	1/500	Santa Cruz
<b>Akt-P (ser 473)</b>	Monoclonal de conejo	1/200	Cell Signaling
<b>Cadherina-E</b>	Monoclonal de ratón	1/2500	Transduction Lab
<b>Erk</b>	Policlonal de conejo	1/500	Santa Cruz
<b>Erk-P</b>	Monoclonal de ratón	1/200	Santa Cruz
<b>FOX C2</b>	Policlonal de cabra	1/500	Abcam
<b>p53</b>	Policlonal de conejo	1/500	NovoCastr
<b>p63</b>	Monoclonal de ratón	1/500	Santa Cruz
<b>p73</b>	Monoclonal de conejo	1/500	Abcam
<b>ΔNp73</b>	Monoclonal de ratón	1/500	Imgenex
<b>PTEN</b>	Policlonal de cabra	1/500	Santa Cruz
<b>S6-P</b>	Policlonal de conejo	1/250	Cell Signaling
<b>Smad2-P</b>	Policlonal de conejo	1/500	Santa cruz
<b>Snail</b>	Rabbit Policlonal	1/1000	Abcam
<b>Stat3-P (Tyr 705)</b>	Policlonal de conejo	1/250	Cell Signaling
<b>Sprouty 2</b>	Policlonal de conejo	1/500	Santa Cruz
<b>Twist</b>	Policlonal de conejo	1/5000	Abcam
<b>Vimentina</b>	Monoclonal de ratón	1/200	Biogenex
<b>Zeb1</b>	Policlonal de cabra	1/500	Santa Cruz
<b>Actina</b>	Policlonal de cabra	1/500	Santa Cruz
<b>GAPDH</b>	Policlonal de conejo	1/2000	Santa Cruz
ANTICUERPOS SECUNDARIOS			
ESPECIFICIDAD	CONJUGADO	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL
<b>Ratón</b>	Peroxidasa	1:5000	Jackson
<b>Conejo</b>	Peroxidasa	1:5000	Jackson
<b>Cabra</b>	Peroxidasa	1:10000	Santa Cruz

## 16. Análisis de expresión génica y de microARNs mediante qRT-PCR

### 16.1. Aislamiento de ARN y microARNs

La extracción de ARN total se realizó a partir de células y tejido conservados en RNA later (Ambion) utilizando el kit miRNAeasy Mini Kit (Qiagen). La piel se disgregó y homogeneizó con el homogeneizador Biometa (Retsch) a una frecuencia de 40/s durante 4 minutos.

Durante el proceso de extracción, se realizó una incubación con ADNasa (Qiagen) según las recomendaciones del fabricante para eliminar el ADN genómico.

La concentración del ARN obtenido se midió mediante espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop Technologies.)

### 16.2. Retrotranscripción

La transcripción reversa del ARN mensajero para la obtención de ADN complementario (ADNc) se realizó a partir de 1µg de ARN total en el caso del ARN procedente de las células y de 400 ng en el caso del ARN procedente de tejido. Para ello se empleó el kit de retrotranscripción *Omniscript® Reverse Transcription kit* (Qiagen) usando cebadores oligo-dT para el ARN mensajero.

Para la transcripción reversa de micro ARN se utilizó el kit *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription* (Applied biosystems) utilizándose 10 ng de muestra por reacción y cebadores específicos para cada micro ARN

### 16.3. PCR a tiempo real

La amplificación por PCR cuantitativa a tiempo real del ARN mensajero se realizó con cebadores específicos y *Power SYBR Green PCR Master Mix de Applied Biosystems* y 1 µl del ADN complementario (ADNc) obtenido de la retrotranscripción. Se utilizó el equipo *7500 Fast Real-Time PCR System* para realizar las PCRs y se cuantificó mediante el cálculo relativo del incremento del *cycle threshold* (Ct) entre las muestras problema y el gen control GUSB.

Los cebadores empleados para PCR cuantitativa se enumeran en la siguiente tabla:

Nombre (Humano)	Secuencia 5'--> 3'
F-hSnail	GCTGCAGGACTCTAATCCAGA

R-hSnail	ATCTCCGGAGGTGGGATG
Hu-TP63 TA_F	TGTATCCGCATGCAGGACT
Hu-TP63 TA_R	CTGTGTTATAGGGACTGGTGGAC
Hu-TP63 ΔN_F	GAAAACAATGCCCAGACTCAA
Hu-TP63 ΔN_R	TGCGCGTGGTCTGTGTT
F-GUSB	CGCCCTGCCTATCTGTATTC
R-GUSB	TCCCCACAGGGAGTGTGTAG

Nombre (Ratón)	Secuencia 5'--> 3'	Nombre (Ratón)	Secuencia 5'--> 3'
m_PTEN_F	GAAAGGGACGGACTGGTGTA	E2F1_F	TGCCAAGAAGTCCAAGAATCA
m_PTEN_R	TAGGGCCTCTTGTGCCTTTA	E2F1_R	CTTCAAGCCGCTTACCAATC
m-TWIST 1_F	AGCTACGCCTTCTCCGTCT	E2F2_F	GGCTTCCCCAGTCTTTTGTAT
m-TWIST 1_R	TCCTTCTCTGGAAACAATGACA	E2F2_R	TGTGAGCTTGTTCCCACGCTA
m-Zeb1_F	AGGTGATCCAGCCAAACG	E2F3_F	CAAGGACCCTCCAGCAGAG
m-Zeb1_R	GGTGGCGTGGAGTCAGAG	E2F3_R	AGTTCCAGCCTTCGCTTTG
m-Zeb2_F	AAGCCAGGGACAGATCAGC	E2F4_F	GAACTGGACCAGCACAAAGGT
m-Zeb2_R	CACACTCCGTGCACTTGAA	E2F4_R	CATGAGTCACGTAGGCCAAGC
F-Snail	CACCTCCAGACCCACTCAGAT	E2F5_F	GCGTCCTGGATCTCAAAGC
R-Snail	CCTGAGTGGGGTGGGAGC	E2F5_R	GATATCATAAATCTTCGCTTTTGC
m-E-Cad_F	ATCCTCGCCCTGCTGATT	E2F6_F	ACCACGCCTAGTCCAAGACAA
m-E-Cad_R	ACCACCGTTCTCTCCGTA	E2F6_R	CCAACAATCCAGGTTCCATCA
m-FoxC2_F	GCTTTCCTGCTCATTCGTCTT	E2F7_F	TGTTACGTGAGACATCCGGTA
m-FoxC2_R	AAATATCTTACAGGTGAGAGGCAA	E2F7_R	GGATGCTCTTGGGAGTCG
m_RB_F	CACGTGTAAATTCTGCTGCAA	E2F8_F	GGCATTACAGACATGTGCTTCG
m_RB_R	ACAGGGCAAGGGAGGTAGAT	E2F8_R	GCTCATCACGCGTAAGGACTT
m_p130_F	AAGGCACATGCTAACCAATGAA	DP1_F	GCTCAGGAGTGCCAGAACTT
m_p130_R	GAGCAGTTACCGCAGCATGA	DP1_R	TGGAGCTGTGACTGCTTCTG
m-ΔNp63_F	CAAAACCCTGGAAGCAGAAA	mGUS-B_F	GAGGATCAACAGTGCCCAT
m-ΔNp63_R	GAGGAGCCGTTCTGAATCTG	mGUS-B_R	CAGCCTCAAAGGGGAGGT
m-TAp63_F	GTGTATGAACCTTCCGAAAA	m-FOXN1_F	TGTGGGCCCTCAATCCTTC
m-TAp63_R	GAGGAGCCGTTCTGAATCTG	m-FOXN1_R	AAGGGAAAACTGGGCTCTCC

Por otro lado, la amplificación por PCR cuantitativa de micro ARN se realizó con cebadores específicos, el kit *TaqMan® Gene Expression Master Mix* (Applied biosystems) y 0,7 µl del ADN complementario obtenido de la retrotranscripción. Se utilizó el equipo *7500 Fast Real-Time PCR System* para realizar las PCRs, que se cuantificaron mediante el cálculo relativo del incremento del *cycle threshold* (Ct) entre las muestras problema y el control U6B o Sno234. Las sondas *TaqMan* para *microRNA Assays* se obtuvieron de Applied Biosystems (Foster City, CA). La amplificación de un único fragmento se verificó mediante curvas de Melting.

## 17. Análisis de microarrays

El ARN total con la fracción de microARN de tumores y pieles de ratones adultos se envió al Centro Nacional de Biotecnología de Madrid para su hibridación con el biochip de Exiqon miCURY LNA™ v 11.0 que cuenta con más de 1700 sondas que incluyen humanos, ratón y rata.

Los análisis estadísticos posteriores se hicieron con el programa informático *MultiExperiment Viewer* (MeV) (Saeed et al., 2003).

La expresión diferencial de los microARNs entre muestras tumorales y pieles de ratones adultos control se obtuvo mediante análisis simultáneo con SAM (FDR  $q < 0.01$ ) y T-test ( $p < 0.01$ ), seleccionándose 448 microARNs con expresión diferencial entre las muestras. Los mismos criterios fueron usados en el análisis entre muestras de tumores diferenciados frente a tumores indiferenciados.

El análisis no supervisado para de las dianas de miR21, miR29 y miR105 se realizó una manera similar utilizando el conjunto de muestras tumorales anterior.

Se utilizó una firma de 20 genes derivados de tumores de ratones deficientes en p53 (Garcia-Escudero et al., 2010) para estratificar a pacientes humanos con adenocarcinoma de pulmón humano (Duenas et al., 2012). Los niveles de expresión génica y la información clínica de las muestras humanas analizadas en curvas de Kaplan-Meier se obtuvieron de la base de datos “Gene Expression Omnibus” (GEO) del NCBI a partir del identificador GSE68465.

Para estratificar a los pacientes de cáncer de pulmón humano conforme a la expresión de miR21, se utilizaron dos conjuntos de datos externos diferentes: carcinomas de células escamosas de pulmón con identificador GEO GSE16025 (Raponi et al., 2009) y cáncer de pulmón de células pequeñas (Document S2, Supplemental Data; Yu et al., 2008).

## 18. Citometría de flujo

### 18.1. Estudio en sangre periférica y timo

Para los estudios de citometria de flujo en sangre periférica se utilizó sangre recién extraída (aproximadamente 200  $\mu$ l de sangre en 40  $\mu$ l de EDTA). Se preparó un tubo por cada animal con 25-50  $\mu$ l de sangre y se añadieron los anticuerpos primarios (en oscuridad).

Para el estudio en timo se realizó una disgregación mecánica de una porción del órgano, y se contaron  $10^5$  células por tubo donde se añadieron los anticuerpos (en oscuridad).

Se incubaron 20 minutos a 4°C en oscuridad. Se añadieron a cada tubo 3 ml de PBA (PBS+ azida sódica al 2%) y se centrifugaron a 1200 rpm 7 minutos. Tras retirar el sobrenadante, se añadieron 3 ml de solución de lisis y se tuvieron 10 minutos en oscuridad. Se centrifugaron de la misma forma, se retiró nuevamente el sobrenadante. Se añadieron aproximadamente 300 µl de PBA con DAPI (10 µg/µl) para analizar la expresión de los antígenos en las células vivas y se analizó en el citómetro.

Los anticuerpos empleados en los estudios de citometría se enumeran en la siguiente tabla:

ANTICUERPOS PRIMARIOS			
Anticuerpo	Clon	Huésped	Casa
<b>Ly-6G (Gr-1)-Biotin</b>	RB6-8C5	Rat IgG2b ,κ	BD Pharmingen
<b>CD11b (Mac-1)-biotin</b>	M1/70	Rat IgG2b	BD Pharmingen
<b>CD3-ε-PE</b>	145-2C11	Hamster IgG	BD Pharmingen
<b>CD45R/B220-Cy-Ch5</b>	RA3-6B2	Rat IgG2a ,κ	BD Pharmingen
<b>CD45R/B220-PE</b>	RA3-6B2	Rat IgG2a ,κ	BD Pharmingen
<b>TER-119-PE</b>	TER119	Rat IgG2b ,κ	BD Pharmingen
<b>CD4 FITC</b>	H129.19	Rat IgG2a, κ	BD Pharmingen
<b>CD8 PE</b>	53-6.7	Rat IgG2a	BD Pharmingen



## *Resultados*



# Resultados

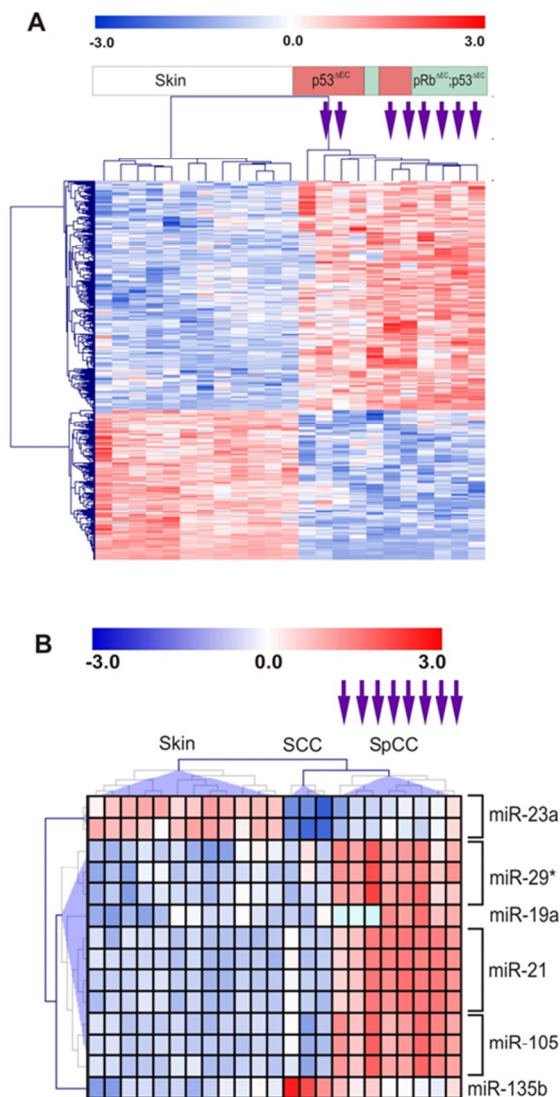
---

## 1. Papel de miR21 en el desarrollo tumoral y su potencial metastásico

Datos previos de nuestro grupo demostraron que la ausencia de p53 en epitelios estratificados (*Trp53<sup>F/F</sup>;K14Cre*, en adelante *Trp53<sup>ΔEC</sup>*) conduce al desarrollo de tumores espontáneos, identificados como carcinomas escamosos con diversos niveles de diferenciación. En estos mismos estudios se observó que la eliminación del gen *Rb1* (*Rb1<sup>F/F</sup>;K14Cre*, en adelante *Rb<sup>ΔEC</sup>*) en este contexto no afecta a las características histopatológicas de los tumores teniendo en ambos casos el mismo origen y localización, aunque los tumores se producen mucho más temprano en los animales *Rb<sup>ΔEC</sup>; Trp53<sup>ΔEC</sup>*, que en los *Trp53<sup>ΔEC</sup>* (Martinez-Cruz et al., 2008). Esta aceleración se ha visto asociada a un incremento en la inestabilidad genómica, atribuible a la pérdida de p53, y debida al aumento en la proliferación como consecuencia de la pérdida de *Rb1*, y un moderado aumento de procesos inflamatorios (Martinez-Cruz et al., 2009). De forma reseñable, en ambos casos se observó el desarrollo de metástasis pulmonares espontáneas (Martinez-Cruz et al., 2008). De hecho, a partir de estudios de transcriptómica de estos tumores, se observaron importantes similitudes con múltiples tumores humanos caracterizados por la alteración en *TP53* y un mal comportamiento clínico, incluyendo un desarrollo temprano de metástasis distales (Duenas et al., 2012 , Garcia-Escudero et al., 2010). En consecuencia, los tumores que se desarrollan de forma espontánea en animales *Rb<sup>ΔEC</sup>;Trp53<sup>ΔEC</sup>* y *Trp53<sup>ΔEC</sup>* pueden representar un modelo relevante para el estudio de los procesos metastásicos de carcinomas escamosos, y podrían ser extrapolables a un amplio número de tipos tumorales de pacientes humanos, incluyendo pulmón y mama (Duenas et al., 2012).

En los últimos años muchos estudios han señalado a los microARNs como reguladores de los procesos de malignización tumoral (Cano et al., 2010; Gregory et al., 2008a; Landi et al., 2010; Ma and Weinberg, 2008b) y han relacionado el supresor tumoral p53 con la expresión alterada o la maduración de microARNs (He et al., 2007b; Raver-Shapira and Oren, 2007; He et al., 2007a; Suzuki and Miyazono, 2010). Por ello, para determinar el posible papel de los microARNs en los tumores procedentes de los animales deficientes en p53 en epitelios estratificados (*Rb<sup>ΔEC</sup>;Trp53<sup>ΔEC</sup>* y *Trp53<sup>ΔEC</sup>*), se realizaron análisis de expresión diferencial de microARNs entre piel no tumoral y tumores espontáneos con distintos grados de diferenciación. Estos estudios mostraron que 210 microARNs diferentes (de 448 sondas con anotación) podían discriminar entre epidermis normal y

tumores (fig.4A), si bien no diferencian el genotipo del tumor. Puesto que se ha observado que el desarrollo de metástasis espontáneas se asocia con un menor grado de diferenciación tumoral, y la aparición de lesiones con características de carcinomas de células fusiformes (Duenas et al., 2012, Garcia-Escudero et al., 2010) provenientes de procesos de TEM, nos propusimos identificar microARNs con expresión diferencial entre carcinomas de células escamosas y carcinomas de células fusiformes. Así se obtuvieron 14 sondas que corresponden a los microARNs miR23, miR29, miR19a, miR21, miR105 y miR135b (fig.4B).

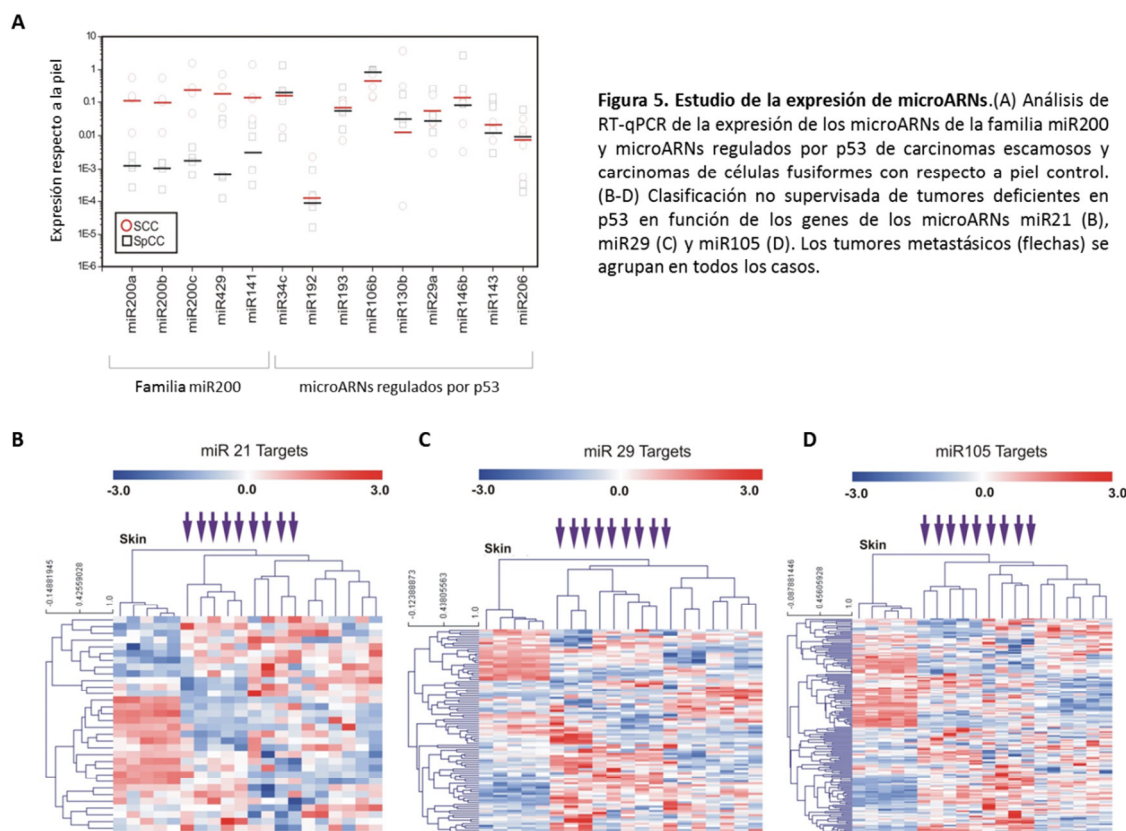


**Figura 4. Análisis de la expresión diferencial de microARNs entre (A) tumores y piel de ratón y (B) piel normal, carcinomas escamosos y carcinomas fusiformes (b). Las flechas corresponden a tumores de células fusiformes.**

De forma relevante, no se encontró en este análisis ningún miembro de las familias miR200 o miR34 o entre los microARNs descritos como dianas de p53, y que han sido ampliamente implicados en estos procesos. Para corroborar esta observación se analizó por RTqPCR una cohorte mayor de muestras tumorales. Los resultados revelaron que, aunque de forma generalizada ambas familias muestran una disminución en los tumores metastásicos, la dispersión entre los valores de las diferentes muestras no permiten observar diferencias significativas entre

los miembros concretos de la familia miR200, o entre los microARNs regulados por p53 e implicados en metástasis (fig.5A).

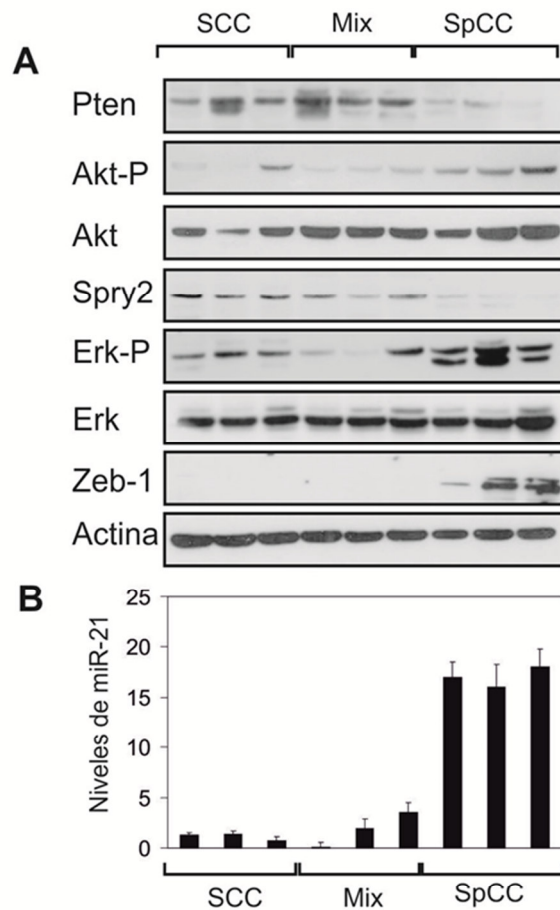
Para confirmar la posible implicación de los microARNs identificados (fig.4B), se realizó una clasificación no supervisada de las muestras en función de la expresión de los genes diana regulados potencialmente por estos microARNs (usando la base de datos miRgen (Megraw et al., 2007)). Este análisis mostró que la expresión de posibles genes diana de miR21, miR29 y miR105 agrupaba a los tumores metastásicos (fig.5B).



**Figura 5. Estudio de la expresión de microARNs.**(A) Análisis de RT-qPCR de la expresión de los microARNs de la familia miR200 y microARNs regulados por p53 de carcinomas escamosos y carcinomas de células fusiformes con respecto a piel control. (B-D) Clasificación no supervisada de tumores deficientes en p53 en función de los genes de los microARNs miR21 (B), miR29 (C) y miR105 (D). Los tumores metastásicos (flechas) se agrupan en todos los casos.

Dado que la sobreexpresión de miR21 se ha asociado con agresividad tumoral y metástasis en un gran número de cánceres humanos (Krichevsky and Gabriely, 2009) nos centramos en este microARN para el estudio detallado de los mecanismos moleculares implicados en estos procesos.

Mediante inmunoblot de muestras correspondientes a carcinomas de células escamosas (SCCs), carcinomas de células fusiformes (SpCC) y tumores que presentaban características de ambos (mix) observamos la disminución en la expresión de Pten y Spry2, dianas reconocidas de miR21 (Sayed et al., 2008; Pezzolesi et al., 2008), en paralelo con un aumento en la activación de Akt y Erk (cuya actividad se ve contrarrestada por Pten y Spry2, respectivamente) y un incremento en los niveles de ZEB1 en tumores fusiformes (fig.6A). Mediante RTqPCR se observó la correlación de estas variaciones con un incremento en la expresión de miR21 en dichas muestras (fig.6B).



**Figura 6. Expresión de marcadores de TEM y miR21.** (A) Alteración de la expresión de marcadores de EMT en tumores de animales deficientes en p53 que se correlaciona con (B) el aumento de expresión de miR-21 en tumores fusiformes.

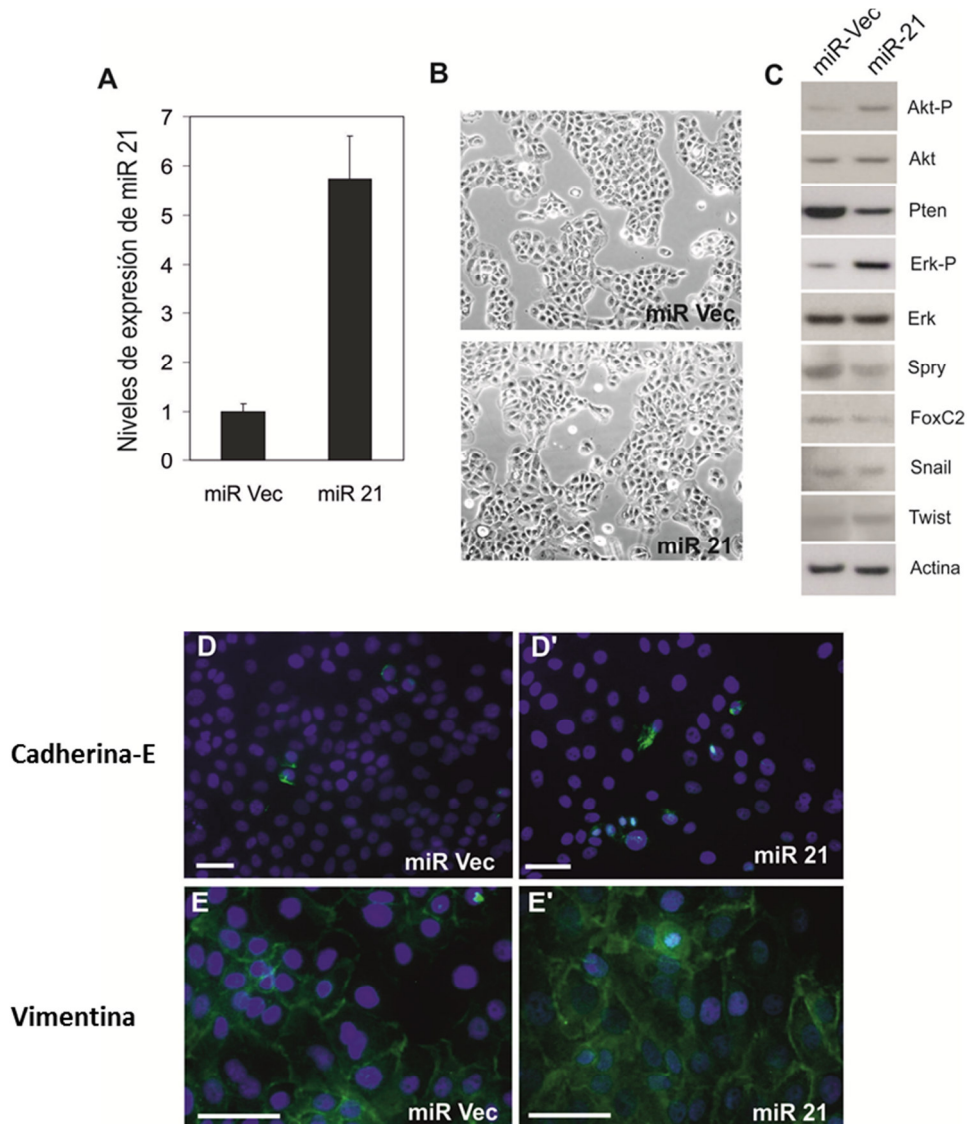
Estos datos nos condujeron al análisis de las consecuencias funcionales de la expresión de miR21 empleando diferentes líneas celulares.

### 1.1. Sobreexpresión de miR21 en queratinocitos inmortalizados

En primer lugar empleamos la línea celular de queratinocitos humanos inmortalizados HaCaT donde estudiamos el efecto ocasionado por el aumento de expresión de miR21, empleando como control un vector vacío (miRvec). Las células HaCat son no tumorales, a pesar de presentar mutaciones en *TP53*, y diferenciar y estratificar *in vitro* de forma análoga a las células primarias humanas (Boukamp et al., 1997).

El aumento de expresión de miR21 (fig.7A) en células HaCaT no condujo a cambios morfológicos de las células (fig.7B). El aumento de miR21 en estas células produjo un descenso

moderado en la expresión de *Spry2* y *Pten*, conocidas dianas de *miR21* (Sayed et al., 2008; Pezzolesi et al., 2008) acompañado por un incremento en la fosforilación de *Erk* y *Akt*. Sin embargo, no encontramos cambios significativos en la expresión y localización de E-cadherina y Vimentina (fig.7D-E), ni en la expresión de los principales reguladores del proceso de TEM como *Snail*, *FoxC2* y *Twist* (fig.7C) en las células transfectadas con *miR21* frente a las células control.



**Figura 7. miR21 es insuficiente para promover la TEM en células HaCat.** (A) Análisis de qPCR de los niveles de *miR-21* en células HaCaT transfectadas con los vectores *miR-Vec* y *miR-21*. (B) Imagen microscópica mostrando la morfología de las células HaCaT transfectadas con los vectores *miR-Vec* y *miR-21*. (C) Análisis de western blot mostrando la expresión de diversas proteínas en las células HaCaT transfectadas. (D y D') Inmunofluorescencia mostrando la expresión de E-Cadherina y (E y E') vimentina en células HaCaT transfectadas con el vector *miRVec* (D y E) y *miR-21* (D' y E').

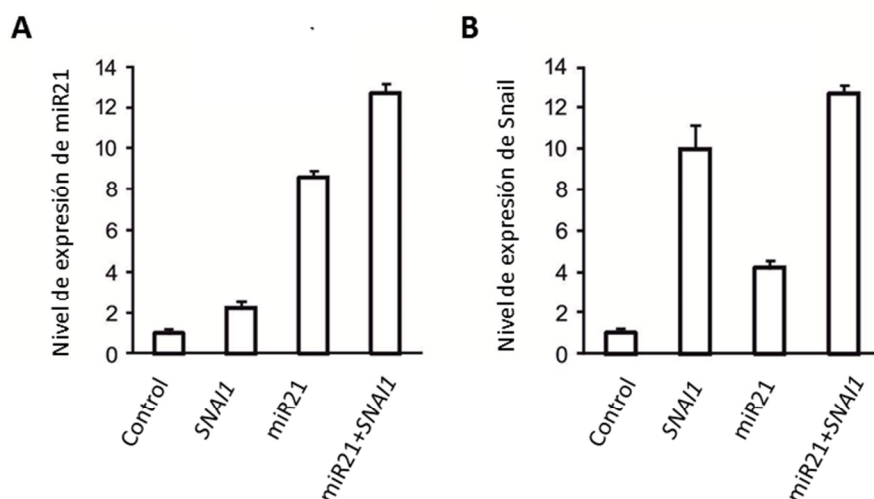
Estos resultados indicaban que la expresión aumentada de miR21 en células no transformadas, no era suficiente para desencadenar la conversión neoplásica ni promover el proceso de TEM.

## 1.2. Efecto de la expresión incrementada de miR21 en queratinocitos transformados de ratón; células PB

Para estudiar si la expresión de miR21 contribuye a la progresión maligna se empleó la línea celular de queratinocitos de ratón PB (Yuspa et al., 1986). Estas células son derivadas de un tumor benigno epidérmico (papiloma), presentan mutaciones en *Trp53*, y su inyección en animales atímicos (*nu/nu*) conduce a la aparición de tumores escamosos muy diferenciados con larga latencia (Segrelles et al., 2002). De forma interesante, la expresión en estas células del oncogen Akt es suficiente para acelerar la aparición de tumores tras la inyección subcutánea y la adquisición de características más agresivas (Segrelles et al., 2002). Como control positivo del proceso de TEM se sobreexpresó *SNAI1*, empleando el gen humano para poder discriminar del *Snai1* endógeno, mientras que como control negativo se utilizaron células PB transfectadas con un vector vacío miRVEC. Asimismo, además de la sobreexpresión de miR21, se realizó una cotransfección miR21 y *SNAI1* para evaluar posibles efectos cooperativos.

La transfección de *SNAI1* en células PB produjo un incremento moderado en la expresión de miR21 por debajo de los niveles obtenidos en la transfección con miR21 o la co-transfección de miR21 y *SNAI1* (fig.8A), indicando que *SNAI1* favorece la expresión de este miARN. Por otro lado, también observamos que la expresión de miR21 era capaz de inducir la expresión de Snail (fig.8B) también en este caso por debajo de los niveles obtenidos mediante la transfección con *SNAI1* o la co-transfección de miR21 y *SNAI1* (fig.8A).

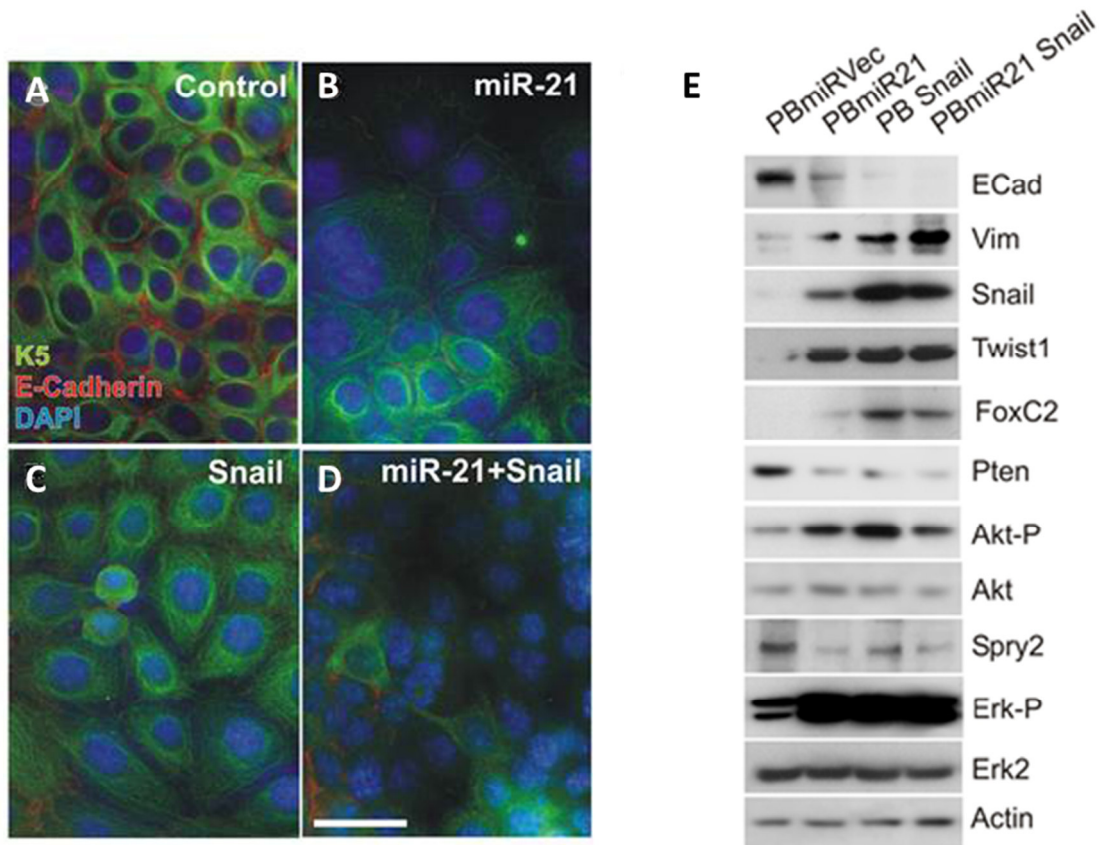




**Figura 8.** Niveles de expresión de miR21 (A) y Snail (B) en células PB transfectadas y células PB control.

Por inmunofluorescencia observamos una disminución de E-cadherina en las células que expresaban miR21 o *SNAI1*, en comparación con las células control, aunque esta disminución era mucho mayor en el caso de las co-transfecciones con *SNAI1* y miR21. También se observó un ligero descenso de expresión de la queratina K5 en las células transfectadas con miR21 y cotransfectadas con *SNAI1* y miR21 (fig.9A-D).

Mediante inmunoblot (fig.9E) se confirmó el aumento de la expresión de Vimentina, Snail y Twist1 junto con un descenso en la expresión de Pten y Spry2 y el concomitante aumento de las formas fosforiladas de Akt y Erk, y en menor medida FoxC2 en todas las células transfectadas en comparación con las controles.

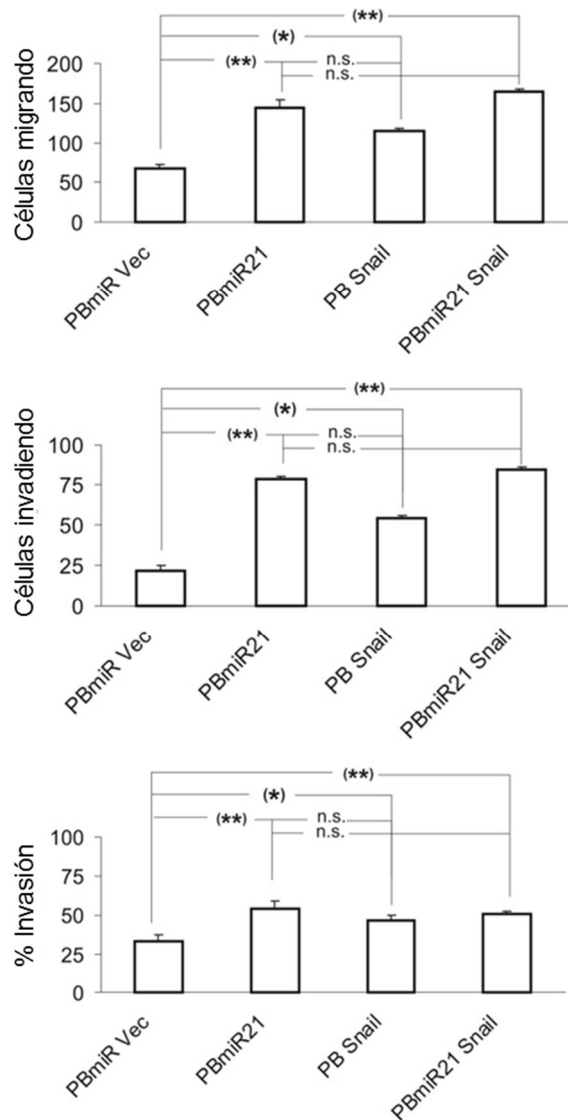


**Figura 9. La expresión forzada de miR21 y *SNAI1* en células PB modifica la expresión de marcadores epiteliales y de TEM. (A-D)** Inmunofluorescencias mostrando E-cadherina (rojo) y queratina K5 (verde) de células PB. (A) Control (células PB transfectadas con vector vacío); (B) Transfectadas con miR21; (C) Snail; (D) Cotransfectadas con miR21 y Snail. (E) Análisis de western blot en células PB y PB transfectadas con los vectores: miRVec, miR21, Snail y miR21+Snail.

Estos datos, mostrando la expresión alterada de proteínas clave en procesos de progresión tumoral y transición epitelio-mesénquima (TEM), sugieren que miR21 puede ser suficiente para promover algunas características de la TEM y cooperar con Snail en el proceso.

Puesto que la TEM favorece la capacidad migratoria e invasiva de las células, analizamos el efecto de la sobreexpresión de miR21, *SNAI1*, o ambas, sobre dicha capacidad de las células PB *in vitro* empleando un sistema de cámaras de Boyden.

El resultado mostró que la sobreexpresión de miR21 o *SNAI1* (pero no la sobreexpresión de ambas respecto a los transfectantes sencillos), aumentaban las propiedades migratorias e invasivas de las células PB (fig.10).

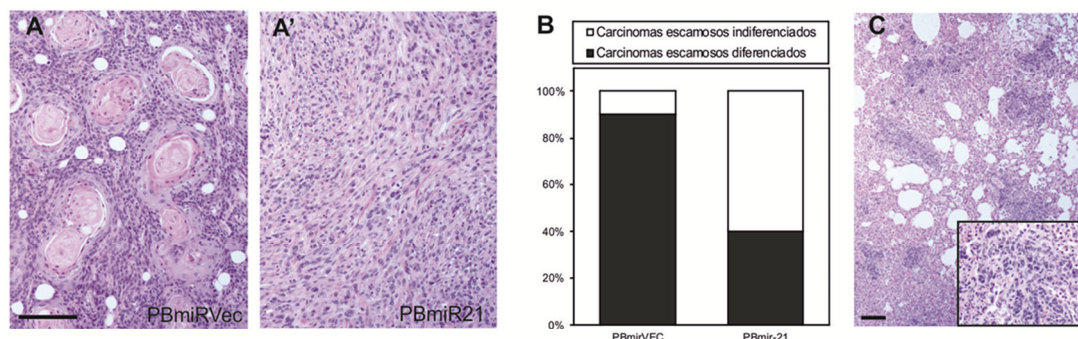


**Figura 10. La expresión de miR21 promueve la capacidad de invasión de las células PB.** Análisis cuantitativo utilizando cámaras de Boyden para ensayos de capacidad migratoria (gráfica superior), invasiva (gráfica media) y porcentaje de invasión (gráfica inferior) de células PB control y PB transfectadas con miR21, Snail o ambas. (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ).

A continuación determinamos en un contexto *in vivo* el posible papel de miR21 en TEM. Para ello se inyectaron  $10^5$  células PBmiR21 y PBmiRVEC por vía subcutánea en el flanco de ratones desnudos, y se analizó la aparición y velocidad de crecimiento de los tumores resultantes, así como sus características histopatológicas.

No observamos diferencias significativas en el momento de la aparición y la velocidad de crecimiento de los tumores entre los dos grupos de ratones. Sin embargo, encontramos que los tumores de los ratones inyectados con células PB control presentaban características de carcinomas de células escamosas bien diferenciados (fig.11A,B), mientras que los ratones

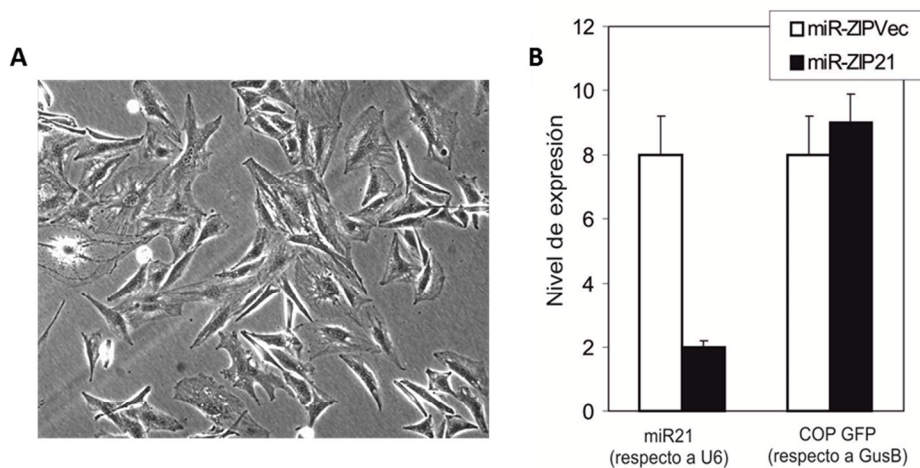
inyectados con células PBmiR21 ofrecían un aspecto más indiferenciado (fig.11A',B). Además, de los 5 ratones inyectados con células PBmiR21, 3 desarrollaron metástasis en los ganglios proximales y en los pulmones (fig.11C) mientras que en ninguno de los animales inyectados con células PBmiRVec se observó el desarrollo de metástasis espontáneas.



En consecuencia, estos datos demuestran que la sobreexpresión de miR21 en células PB confiere características tumorales más agresivas y desarrollo de metástasis.

### 1.3. Consecuencias del bloqueo de miR21 en células tumorales de ratón $Rb^{\Delta CE}; Trp53^{\Delta CE}$

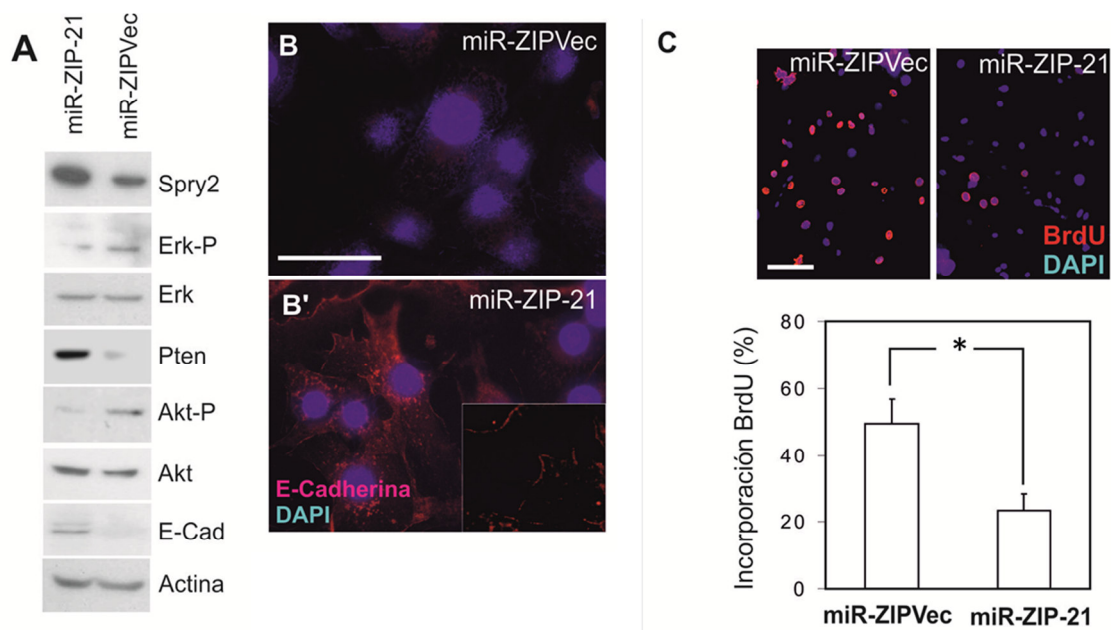
Para confirmar los resultados anteriores, nos propusimos bloquear la actividad de miR21. Para ello establecimos diversas líneas celulares derivadas de tumores de ratones  $Rb^{\Delta EC}; Trp53^{\Delta EC}$ , seleccionando la línea celular 940T (fig.12A), por presentar las características más indiferenciadas, y un mejor crecimiento *in vitro*. Estas células proceden de un tumor espontáneo indiferenciado en un animal  $Rb^{\Delta EC}; Trp53^{\Delta EC}$  que presentó metástasis espontáneas en pulmón. Para el bloqueo de la expresión de miR21 se empleó el sistema miR ZIP de System Biosciences. Este se basa en la expresión mediante vectores lentivirales de construcciones anti-sentido de los microARNs dianas junto con COPGFP como marcador. Estos miRZip producen shARNs cortos, anti-microARNs de cadena sencilla que se unen competitivamente a su microARN diana endógeno e inhiben su función. En concreto se empleó la construcción miR-ZIP-21 (fig.12B).



**Figura 12. Bloqueo de miR21 en células 940T.** (A) Imagen microscópica de células 940T. (B) Análisis de RT-qPCR mostrando los niveles de expresión de miR21 y el indicador (COP-GFP) en células tumorales 940T transfectadas con el vector vacío miR-ZIPVec y el vector miR-ZIP21.

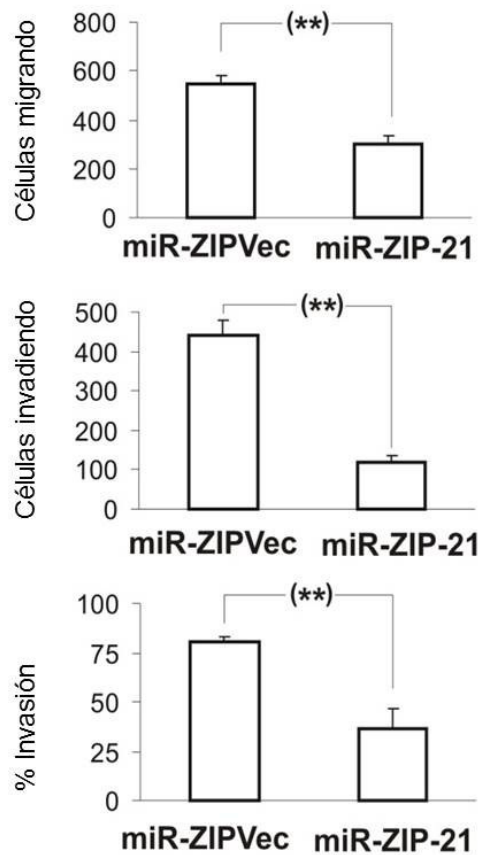
En los cultivos de células 940miR-ZIP-21 se observó un incremento en la expresión de Spry2 y Pten en paralelo a una reducción de la actividad de Erk y Akt (fig.13A). También se observó un aumento de la expresión de E-cadherina (fig.13A,B) indicando una reversión parcial del fenotipo mesenquimal hacia uno con características más epiteliales.

Mediante ensayos de incorporación de BrdU comprobamos que la proliferación en las células 940miR-ZIP-21 disminuía con respecto a las células control (fig.13C).



**Figura 13. El bloqueo de miR21 en células 940T disminuye la proliferación y la TEM**(A) Análisis de WB en células 940T transfectadas. (B), (B') Inmunofluorescencia mostrando el aumento en la expresión de E-Cadherina (rojo) en células 940miR-ZIP-21 con respecto a células control.(C) Incorporación de BrdU en células 940T control y 940miR-ZIP-21 (\* p=0,0178)

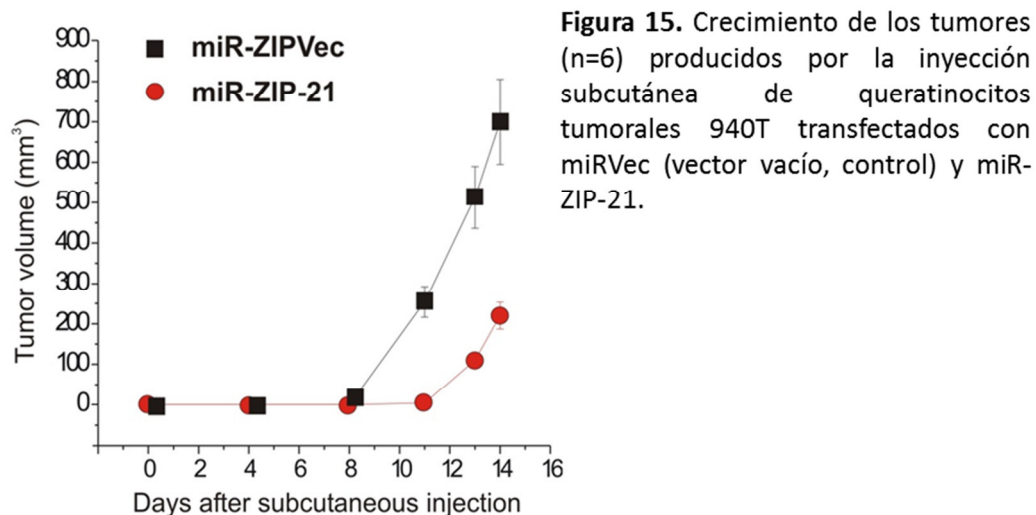
Asimismo, mediante ensayos en cámaras de Boyden observamos que, tanto la migración como la invasión presentada por las células control, se reducía en las células 940miR-ZIP-21 (fig.14).



**Figura 14. El bloqueo de miR21 en células 940T disminuye su capacidad invasiva.** Análisis cuantitativo de los queratinocitos tumorales 940T transfectados con miR-ZIPVec y miR-ZIP21 de ensayos de capacidad de migración (arriba) e invasión (medio) y el porcentaje de invasión (abajo). ( $p < 0.01^{**}$ )

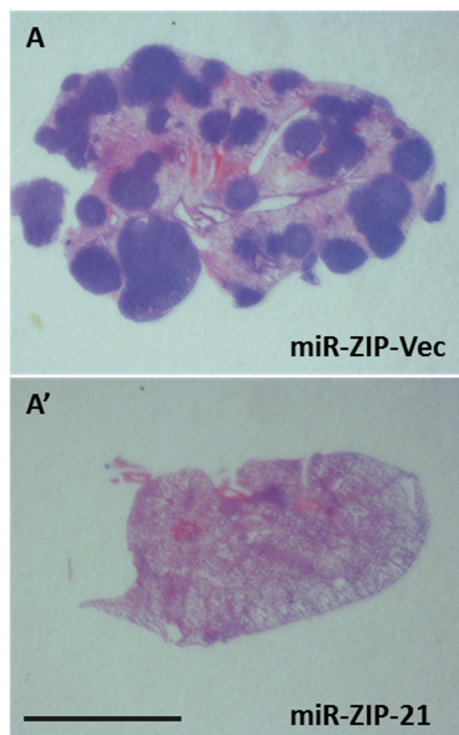
A continuación se evaluó el efecto del bloqueo de miR21 en un contexto *in vivo*. Con este fin se inyectaron células 940T transfectadas con miR-ZIPVec y miR-ZIP21 por vía subcutánea en ratones inmunodeficientes. Si bien no se observaron cambios en la histopatología de los tumores, sí se detectó un ligero retraso del crecimiento tumoral (fig.15).





No observamos desarrollo de metástasis pulmonares espontáneas tras la inyección de  $10^5$  células en los flancos de los animales, probablemente debido al rápido crecimiento de los tumores que obligó al sacrificio de los animales a tiempos muy cortos. Como alternativa para determinar si el bloqueo de miR21 puede afectar a la capacidad metastásica de estas células, se inyectaron  $10^4$  células 940miR-ZIPVec y miR-ZIP-21 en la vena de cola de ratones inmunodeficientes, analizándose la formación de metástasis en pulmón.

Observamos que las células control 940miR-ZIPVec producían el desarrollo de un gran número de metástasis de pulmón ( $48 \pm 10$  por pulmón) (fig.16A) en todos los animales inyectados (8/8). Por el contrario la inyección intravenosa de las células 940miR-ZIP-21 sólo produjo una pequeña micrometástasis (fig.16B) en uno de los ratones inyectados (1/8).



**Figura 16. El bloqueo de miR21 inhibe el desarrollo de metástasis.**

Ejemplos de cortes histológicos de pulmones de animales inyectados en vena de cola con células 940TmiR-ZIP-Vec (A) y miR-ZIP-21 (A'). Barra=1cm.

Estos resultados demuestran que miR21 es necesario para el desarrollo de metástasis a partir de tumores epidérmicos deficientes en p53.

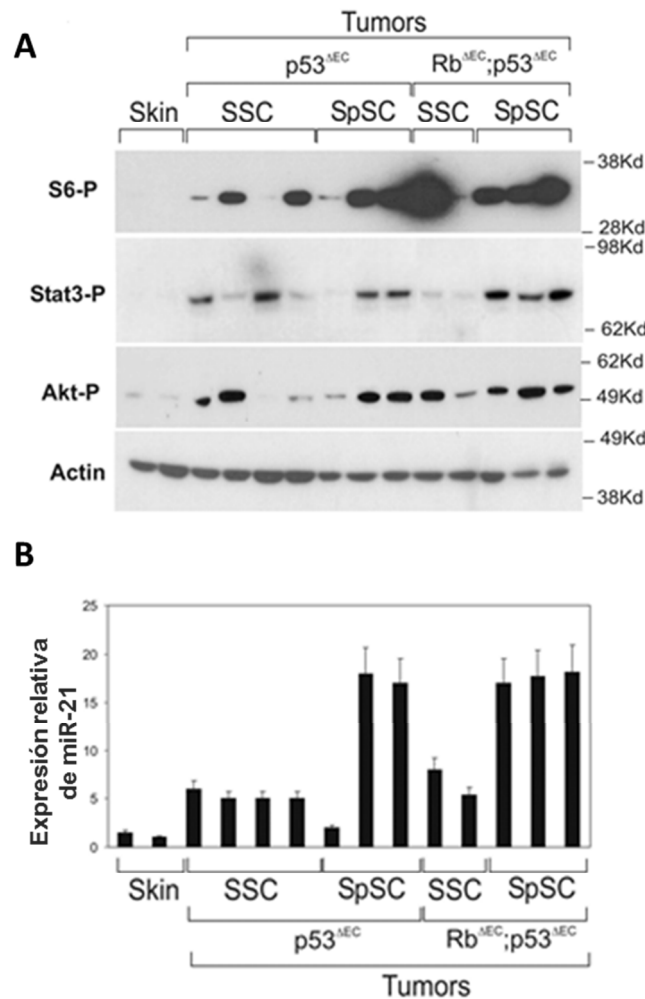
## 2. Tratamientos in vitro para restaurar la expresión de miR21 en tumores y células deficientes en p53.

Los datos anteriores indican que el bloqueo de la expresión de miR21 podría ser una opción terapéutica para prevenir el desarrollo metastásico en tumores deficientes en p53. Sin embargo, es difícil considerar el empleo de construcciones lentivirales como las comentadas anteriormente con este fin. En consecuencia decidimos caracterizar los posibles mecanismos responsables del aumento de la expresión de miR21 con el fin de identificar rutas diana que fueran susceptibles de dicha intervención terapéutica. Una primera posibilidad consiste en que p53 pueda reprimir la expresión de miR21. De hecho, múltiples estudios relacionan el supresor tumoral p53 con la expresión alterada de microARNs (Boominathan, 2010; He et al., 2007a #176; Hermeking, 2007). Sin embargo, no se ha reportado que miR21 sea modulado transcripcionalmente de forma directa por p53. No obstante, p53 es capaz de inhibir diversas rutas de señalización, como mTOR y Stat3 (Feng and Levine, 2010; Feng et al., 2005; Lin et al., 2002a; Lin et al., 2002b) que sí son capaces de modular la expresión de miR21 (Loffle et al., 2007; Darido et al., 2011).

Mediante inmunoblot observamos una actividad incrementada de mTOR (analizada por la proteína ribosomal fosforilada S6), y de Stat3 (determinada por Stat3 fosforilada), preferentemente



en carcinomas indiferenciados de células fusiformes (fig.17A), en paralelo con el aumento de la expresión de miR21 determinada mediante RTqPCR (fig.17B).

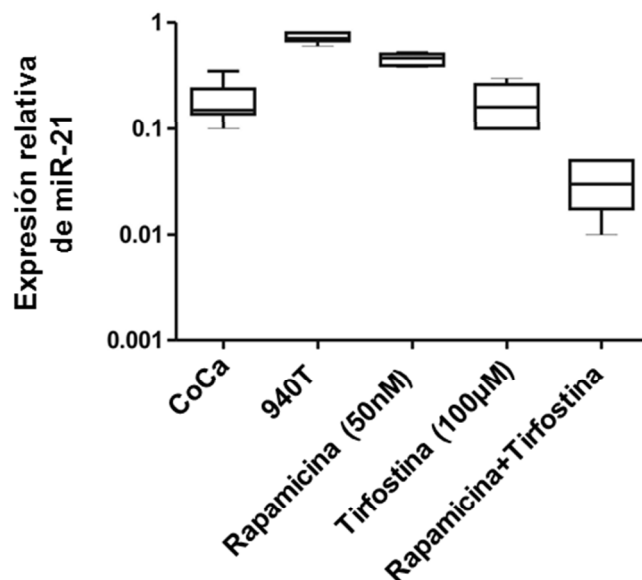


**Figura 17. La expresión de miR21 en tumores espontáneos de animales deficientes en p53 está modulada por mTOR y Stat3.**

A) Western blot de la expresión de las proteínas S6-P, Stat3-P y Akt-P en piel y muestras de tumores de diversos genotipos y fenotipos. (B) Niveles de expresión de miR-21 de los tumores mostrados en A analizados por qRT-PCR.

Estos datos nos condujeron a analizar el efecto de los inhibidores farmacológicos de las rutas de señalización de mTOR y Stat3 sobre la expresión de miR21. Para ello las células 940T se trataron durante 48 horas con rapamicina (inhibidor de mTOR), tirfostina (inhibidor de Stat3) y una combinación de ambas. Como control de niveles no pretumorales de la expresión de miR21 empleamos la línea celular inmortalizada no tumoral de queratinocitos de ratón CoCa (Segrelles et al., 2011).

Mediante RTqPCR comprobamos que los niveles de miR21 (fig.18) disminuían con los tratamientos individuales de los inhibidores de mTOR (Rapamicina) o Stat3 (Tirfostina). Además el tratamiento con ambos inhibidores condujo a una reducción de alrededor de cien veces de dichos niveles, alcanzándose valores inferiores a los detectados en células control.



**Figura 18. La expresión de miR21 está modulada por mTOR y Stat3 en tumores espontáneos.**

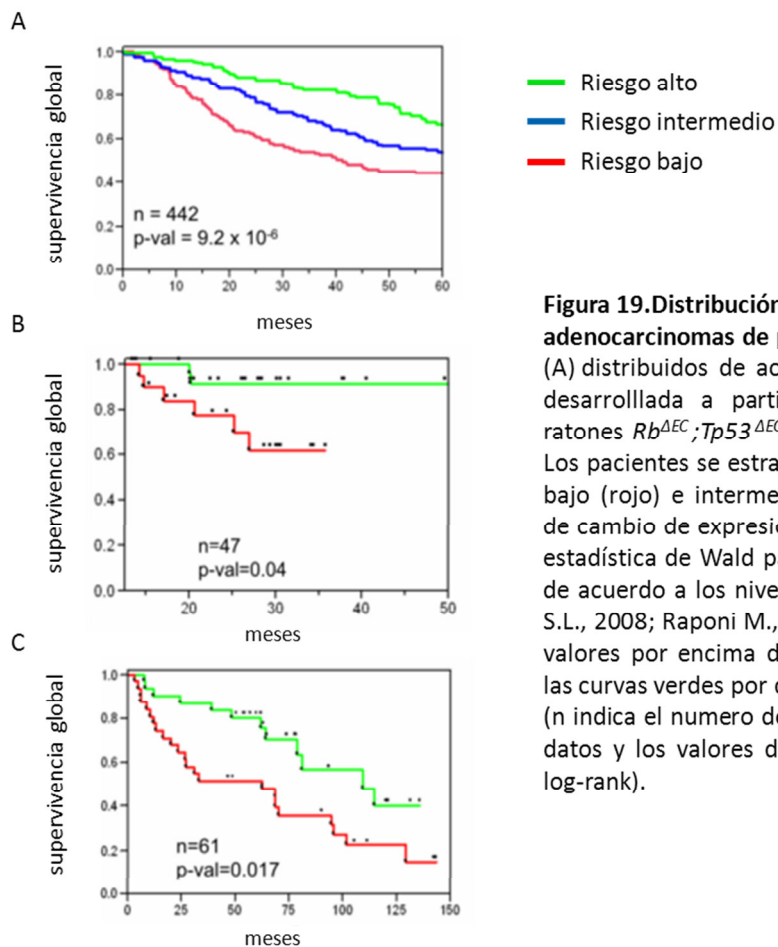
Análisis por qRT-PCR de los niveles de miR-21 de células CoCa (control) y queratinocitos tumorales 940T no tratados y tratados con los inhibidores Rapamicina y Tirfostina y ambos durante 48horas.

Estos datos apuntan a que el bloqueo de las rutas de señalización de mTOR y Stat3 podría ser una aproximación para impedir el desarrollo de metástasis en tumores epiteliales carentes de p53.

### 3. La expresión de miR21 aumenta en el cáncer de pulmón metastásico en humanos

Los resultados anteriores nos llevaron a analizar si un proceso similar podría llevarse a cabo en muestras de cáncer humano. Hemos demostrado previamente que los tumores derivados de ratones *Tp53<sup>AEC</sup>* y *Rb<sup>AEC</sup>;Tp53<sup>AEC</sup>* muestran un solapamiento significativo con múltiples tumores humanos caracterizados por un aumento de la agresividad y desarrollo metastásico (Garcia-Escudero et al., 2010). Estos cánceres epiteliales comprenden diferentes tejidos de origen, como mama y pulmón (Garcia-Escudero et al., 2010). En particular, se observó que en el cáncer no

microcítico de pulmón, una firma de 20 genes derivados de tumores de ratones deficientes en p53 (Garcia-Escudero et al., 2010), puede estratificar a los pacientes humanos y predecir la supervivencia general a partir de un conjunto de datos externo de muestras de adenocarcinoma de pulmón humano (fig.19A) (Shedden et al., 2008). Además, miR21 se ha considerado un oncogén en cáncer de pulmón humano (Hatley et al., 2010; Seike et al., 2009; Volinia et al., 2006). De acuerdo con eso, en dos conjuntos de datos externos de cáncer de pulmón (Raponi et al., 2009; Yu et al., 2008) el aumento de expresión de miR21 también es predictivo de la supervivencia global (fig.19B,C).



**Figura 19. Distribución de pacientes humanos con adenocarcinomas de pulmón:**

(A) distribuidos de acuerdo a la firma de 20 genes desarrollada a partir de tumores epiteliales de ratones *Rb<sup>ΔEC</sup>*; *Tp53<sup>ΔEC</sup>* y *Tp53<sup>ΔEC</sup>* (Shedden K., 2008). Los pacientes se estratificaron en riesgo alto (verde), bajo (rojo) e intermedio (azul) calculado por veces de cambio de expresión y la correspondiente prueba estadística de Wald para cada gen. (B,C) distribuidos de acuerdo a los niveles de expresión de miR21 (Yu S.L., 2008; Raponi M., 2009). Las curvas rojas indican valores por encima del valor medio de expresión y las curvas verdes por debajo. (n indica el numero de pacientes para cada grupo de datos y los valores de  $p$  fueron obtenidos por test log-rank).

Estos resultados, demuestran que la expresión de miR21 está elevada en los tumores de pulmón humanos con *TP53* mutado y la firma de genes desarrollado a partir de los tumores epiteliales de ratones *Tp53<sup>ΔEC</sup>* y *Rb<sup>ΔEC</sup>*; *Tp53<sup>ΔEC</sup>* es un sistema eficaz para la estratificación de los pacientes con adenocarcinomas de pulmón y en particular los tumores que muestran metástasis distal.

## 4. Posible papel de p63 en el desarrollo tumoral y el potencial metastásico

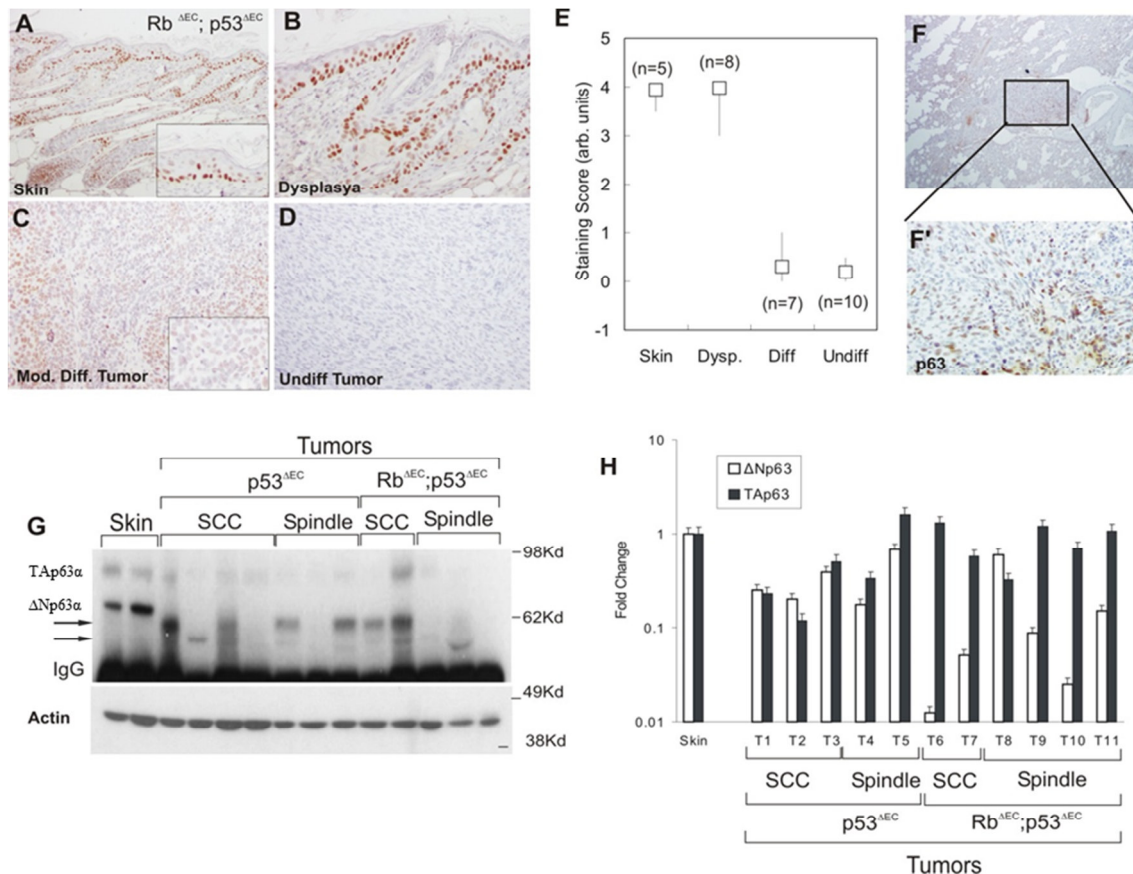
El gen *Trp63* pertenece a la familia de p53 y es esencial para el mantenimiento y desarrollo de los epitelios estratificados (Mills et al., 2002; Koster et al., 2004). Este gen produce, mediante el uso de promotores alternativos y procesamiento diferencial, al menos 8 proteínas diferentes. Debido al uso de elementos promotores alternativos se generan las proteínas TA y  $\Delta N$  p63. Aunque se han asociado las isoformas TAp63 a funciones análogas a p53, la principal isoforma expresada en tejidos adultos corresponde a  $\Delta N$ p63, siendo  $\Delta N$ p63 $\alpha$  la forma predominante en la capa basal de epitelios estratificados cuya expresión se ha asociado con el mantenimiento de las células madre de estos tejidos (Senoo et al., 2007). Esta isoforma está sobreexpresada en una amplia variedad de tumores de origen epitelial (Hibi et al., 2000; Tonon et al., 2005), asignándosele un posible papel oncogénico. En este sentido, se ha demostrado que la expresión de  $\Delta N$ p63 $\alpha$  coopera con Ha Ras promoviendo el desarrollo de carcinomas de células escamosas en parte a través de una función específica relacionada con la capacidad de inhibir la senescencia inducida por el oncogen Ras (Keyes et al., 2011). Sin embargo, en ciertos tipos de tumores epiteliales, se ha observado una disminución o ausencia de su expresión (Barbieri et al., 2006; Flores et al., 2005; Melino, 2011), en particular, en estadios avanzados de los mismos (Koga et al., 2003; Park et al., 2000; Park et al., 2004; Urist et al., 2002). Esto ha conducido a la hipótesis de que esta proteína puede tener un papel dual, siendo un oncogén en estadios iniciales y comportándose como un posible supresor en estadios avanzados. De acuerdo con esta hipótesis, se ha observado que  $\Delta N$ p63 $\alpha$  puede actuar como un supresor de metástasis al interferir con la señalización dependiente de integrinas o TGF $\beta$  en el contexto de tumores con mutaciones en el gen *TP53*. Sin embargo, el posible papel de p63 en aquellos tumores donde p53 está ausente, como por ejemplo en el caso de mutaciones que originan un codón de parada prematuro, es actualmente desconocido. En este contexto, y dado que estudios recientes apoyan el papel de  $\Delta N$ p63 en la modulación de la TEM (Boominathan, 2010; Tucci et al., 2012; Tran et al., 2013), los tumores espontáneos producidos en epidermis como consecuencia de la pérdida de p53 (ratones *Trp53* <sup>$\Delta CE$</sup>  y *Rb* <sup>$\Delta CE$</sup> ; *Trp53* <sup>$\Delta CE$</sup> ) pueden representar un sistema idóneo para el estudio del posible papel de p63 en la progresión tumoral.

### 4.1. Expresión de p63 en tumores espontáneos y metástasis

Mediante inmunohistoquímica detectamos expresión de p63 en la capa basal de la epidermis en diferentes muestras de piel no tumoral de animales *Trp53* <sup>$\Delta CE$</sup>  y *Rb1* <sup>$\Delta CE$</sup> ; *Trp53* <sup>$\Delta CE$</sup>  (fig.20A,E) equivalente a piel control (no mostrado). Este mismo patrón se observó en el caso de

zonas displásicas (fig.20B,E). Sin embargo, observamos una reducción muy importante del número de células que expresan p63 en CCE con un grado de diferenciación medio o alto (fig.20C,E) hasta ser indetectable en CCE indiferenciados o de células fusiformes (fig.20D,E). En estos últimos, como se comentó anteriormente, es frecuente la aparición de lesiones metastáticas en los pulmones. El estudio mediante inmunohistoquímica reveló que en dichas metástasis se expresaba p63, aun cuando estas lesiones eran provenientes de tumores primarios negativos para su expresión (fig.20F,F'). Estos datos indican que la pérdida de expresión es un evento temprano en la malignización de los tumores de ratones deficientes en p53. Por otro lado, la reactivación de la expresión de p63 en las metástasis sugiere que la pérdida de p63 en los tumores no es un suceso irreversible (como por ejemplo LOH o mutaciones con efecto truncante).

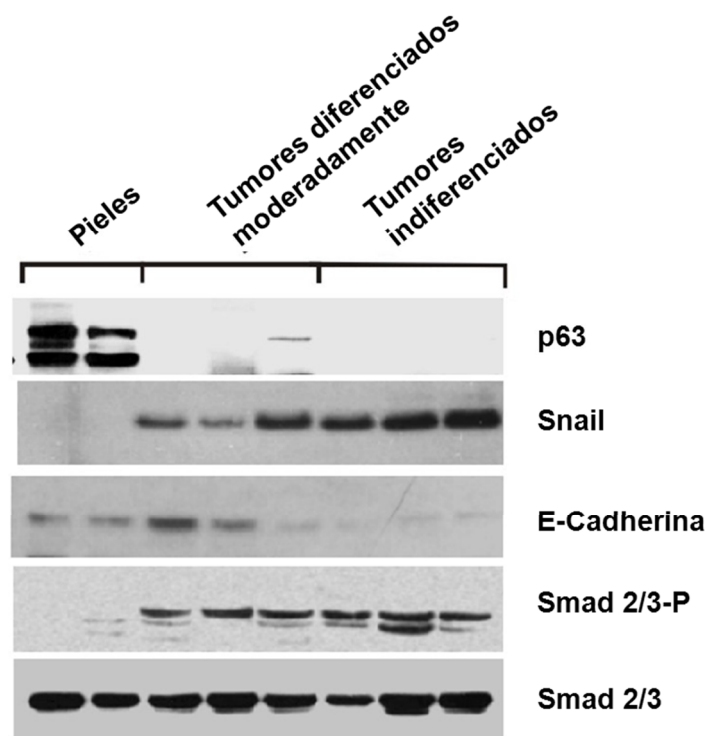
Dado que el anticuerpo empleado (monoclonal 4A4) reconoce todas las isoformas de p63, decidimos complementar los datos de inmunohistoquímica con estudios de inmunoblot y RTqPCR. En el primer caso (fig.20G) se observó que  $\Delta Np63\alpha$  es la forma mayoritaria expresada en piel no tumoral, con una ligera expresión de la isoforma TAp63 $\alpha$ . Ambas isoformas estaban prácticamente ausentes en la mayoría de los tumores con independencia del grado de diferenciación o del genotipo de origen de los mismos (fig.20G). No obstante, en algunos tumores el anticuerpo detectó dos posibles isoformas de p63 con una mayor movilidad electroforética (indicadas por flechas en fig.20G), que no se observan en la piel normal. De acuerdo con su peso molecular, éstas podrían corresponder a las isoformas TAp63 $\beta$  y TAp63 $\gamma$ . El análisis mediante RT-qPCR (fig.20H), empleando cebadores específicos para las isoformas  $\Delta N$  y TAp63, reveló, en comparación con piel no tumoral y de acuerdo con los datos obtenidos mediante inmunohistoquímica e inmunoblot, la disminución generalizada de la isoforma  $\Delta Np63$  en la mayoría de los tumores estudiados, mientras que la expresión de la isoforma TA era variable, estando su expresión disminuida sólo en algunas muestras tumorales. En ambos casos las alteraciones en la expresión de p63 no guardaban relación con el grado de diferenciación ni con el genotipo de los tumores.



**Figura 20. Estudio de la expresión de p63 en los tumores de ratones p53<sup>ΔEC</sup> y Rb<sup>ΔEC</sup>; p53<sup>ΔEC</sup>.** (A-D) IHQ usando un anticuerpo anti-p63 que reacciona con todas las isoformas de p63 en: (A) piel no tumoral, (B) folículo piloso displásico, (C) tumor moderadamente diferenciado y (D) tumor indiferenciado, a partir de muestras de ratones Rb<sup>ΔEC</sup>; p53<sup>ΔEC</sup>. (E) Resumen de la tinción de p63 en diferentes muestras de piel no tumoral, displasias, tumores diferenciados y tumores indiferenciados de ratones Rb<sup>ΔEC</sup>; p53<sup>ΔEC</sup> analizados por IHQ (n= número de muestras estudiadas). (F-F') IHQ usando un anticuerpo anti-p63 sobre metástasis de pulmón. (G) Western blot mostrando las diferentes isoformas de p63 en piel no tumoral, carcinomas de células escamosas y de carcinomas de células fusiformes de ratones p53<sup>ΔEC</sup> y Rb<sup>ΔEC</sup>; p53<sup>ΔEC</sup>. (H) Análisis de qRT-PCR de las isoformas TAp63 y ΔNp63 en la piel no tumoral, carcinomas de células escamosas y carcinomas de células fusiformes de ratones p53<sup>ΔEC</sup> y Rb<sup>ΔEC</sup>; p53<sup>ΔEC</sup>.

La vía de señalización TGFβ/Smad juega un importante papel durante la progresión tumoral epidérmica promoviendo el proceso de TEM que contribuye al desarrollo de metástasis (Derynck et al., 2001), en parte mediante el aumento de la expresión del gen *Snai1*, cuyo producto, la proteína Snail, es capaz de reprimir la expresión de E-cadherina, lo que resulta en la adquisición de características mesenquimales y capacidad invasiva (Cho et al., 2007; Higashikawa et al., 2007). Puesto que se ha reportado que Snail también puede reprimir la expresión de ΔNp63α (Higashikawa et al., 2007), estudiamos la activación de la vía TGFβ/Smad, así como la expresión de Snail y ΔNp63, mediante inmunoblot de diversas muestras tumorales frente a pieles control (fig.21). Este análisis mostró una clara correlación entre la activación de la vía TGFβ/Smad

(detectada mediante la expresión de la forma fosforilada de Smad2/3) y la inducción de Snail, con la pérdida de expresión de p63 y el descenso en la expresión de E-cadherina.



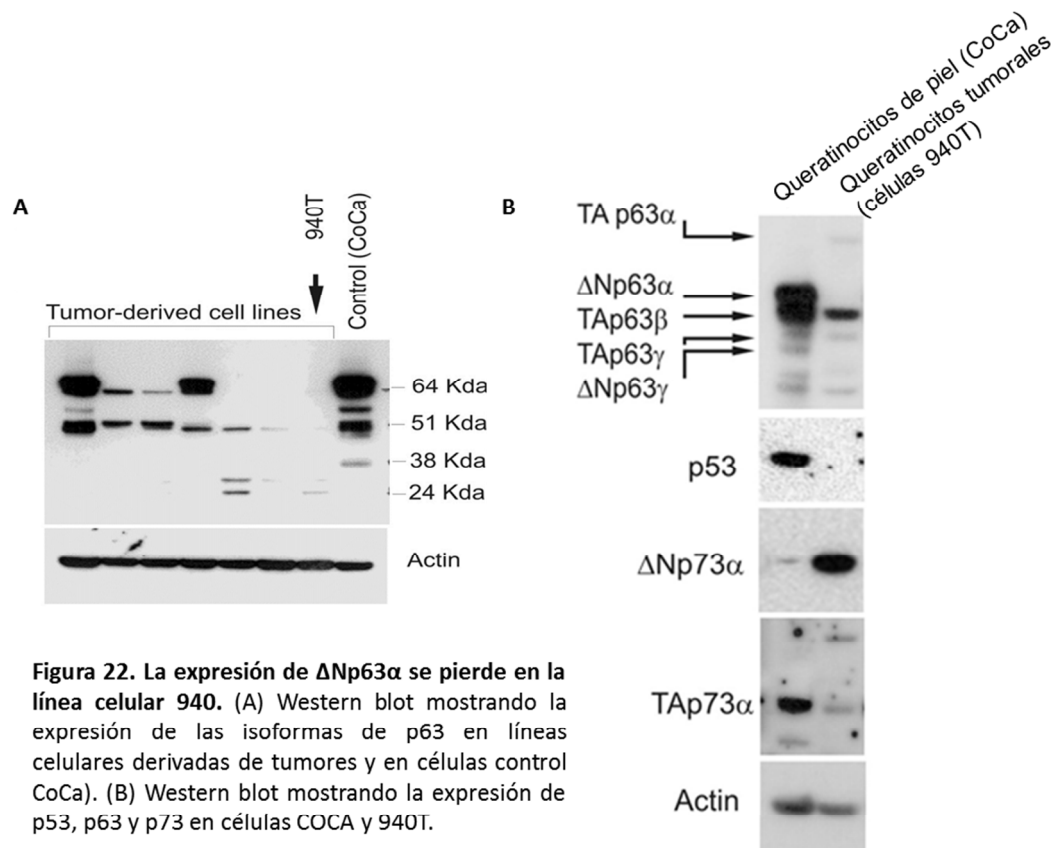
**Figura 21.** La pérdida de p63 se correlaciona con un aumento de expresión de factores de TEM. Western blot de la correlación de la pérdida de p63 con la activación de la vía TGF $\beta$ /Smad, la pérdida de E-cadherina y el aumento de Snail en pieles y tumores diferenciados e indiferenciados de ratones p53<sup>ACE</sup>

#### 4.2. Tratamientos farmacológicos para restaurar la expresión de p63 en células deficientes en p53.

Los datos anteriores, mostrando la reactivación de la expresión p63 en las lesiones metastáticas de pulmón y la correlación entre la expresión de Snail con la reducción de los niveles de p63, sugieren un proceso de silenciamiento transcripcional como responsable de la reducción de la expresión de p63 en los tumores espontáneos. Este proceso sería análogo al reportado en el caso de tumores de próstata y vejiga humanos (Barbieri et al., 2006; Koga et al., 2003).

Para esclarecer esta hipótesis se analizaron diversas líneas celulares derivadas de tumores primarios de animales *Rb*<sup>ACE</sup>; *Trp53*<sup>ACE</sup> (fig.22A) y se seleccionó la línea celular 940T comentada anteriormente y establecida a partir de un tumor espontáneo primario altamente indiferenciado extraído de un animal *Rb*<sup>ACE</sup>; *Trp53*<sup>ACE</sup> que presentó además metástasis pulmonar. Al igual que el

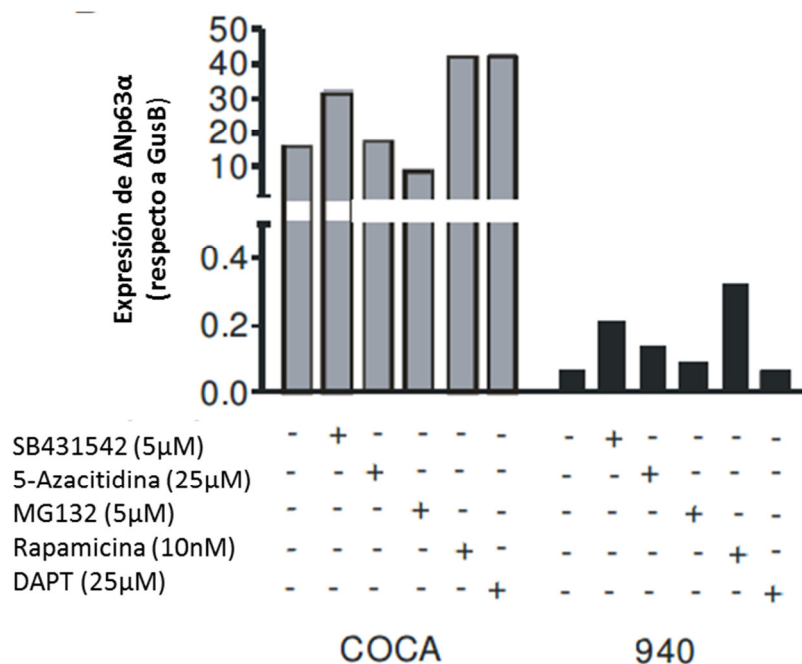
tumor del que proceden, las células 940T se caracterizan por una morfología fusiforme (fig.12B), y en comparación con los queratinocitos inmortalizados COCA (Segrelles et al., 2011) presentan ausencia de p53, expresión de  $\Delta$ Np73 $\alpha$ , y una clara reducción de TAp73 $\alpha$  y  $\Delta$ Np63 $\alpha$  (fig.22B).



**Figura 22. La expresión de  $\Delta$ Np63 $\alpha$  se pierde en la línea celular 940.** (A) Western blot mostrando la expresión de las isoformas de p63 en líneas celulares derivadas de tumores y en células control CoCa). (B) Western blot mostrando la expresión de p53, p63 y p73 en células COCA y 940T.

Con el fin de determinar la posible vía de señalización responsable de la reducción de la expresión de p63, se realizó un tratamiento durante 24 horas de células COCA y 940T con diversos inhibidores farmacológicos, determinándose los niveles de  $\Delta$ Np63 mediante RTqPCR. Entre los inhibidores empleados se incluyó *5-azacitidina*, que inhibe la metilación del ADN, el inhibidor de proteosoma *MG132* y *DAPT*, *SB431542* y *Rapamicina* como inhibidores de la señalización dependiente de Notch, TGF $\beta$  y mTOR, respectivamente. Estas vías se seleccionaron en base a su relevancia en la progresión tumoral de epitelios estratificados y su posible relación con la expresión de p63 (Aomatsu et al., 2011; Ma et al., 2010; Vivanco and Sawyers, 2002). En este estudio se observó un aumento muy limitado de la expresión de  $\Delta$ Np63 por el tratamiento con *5-Aza*, *SB431542* y *Rapamicina* en las células 940T (fig.23). Sin embargo, estos niveles nunca llegaron a los observados en los queratinocitos inmortalizados COCA (fig.23). De forma análoga, el tratamiento con concentraciones mayores de estos inhibidores, o la combinación de los mismos, o por periodos de tiempo incrementados no permitió la reactivación de la expresión de p63 hasta niveles detectables mediante inmunoblot (Paradela, 2011).

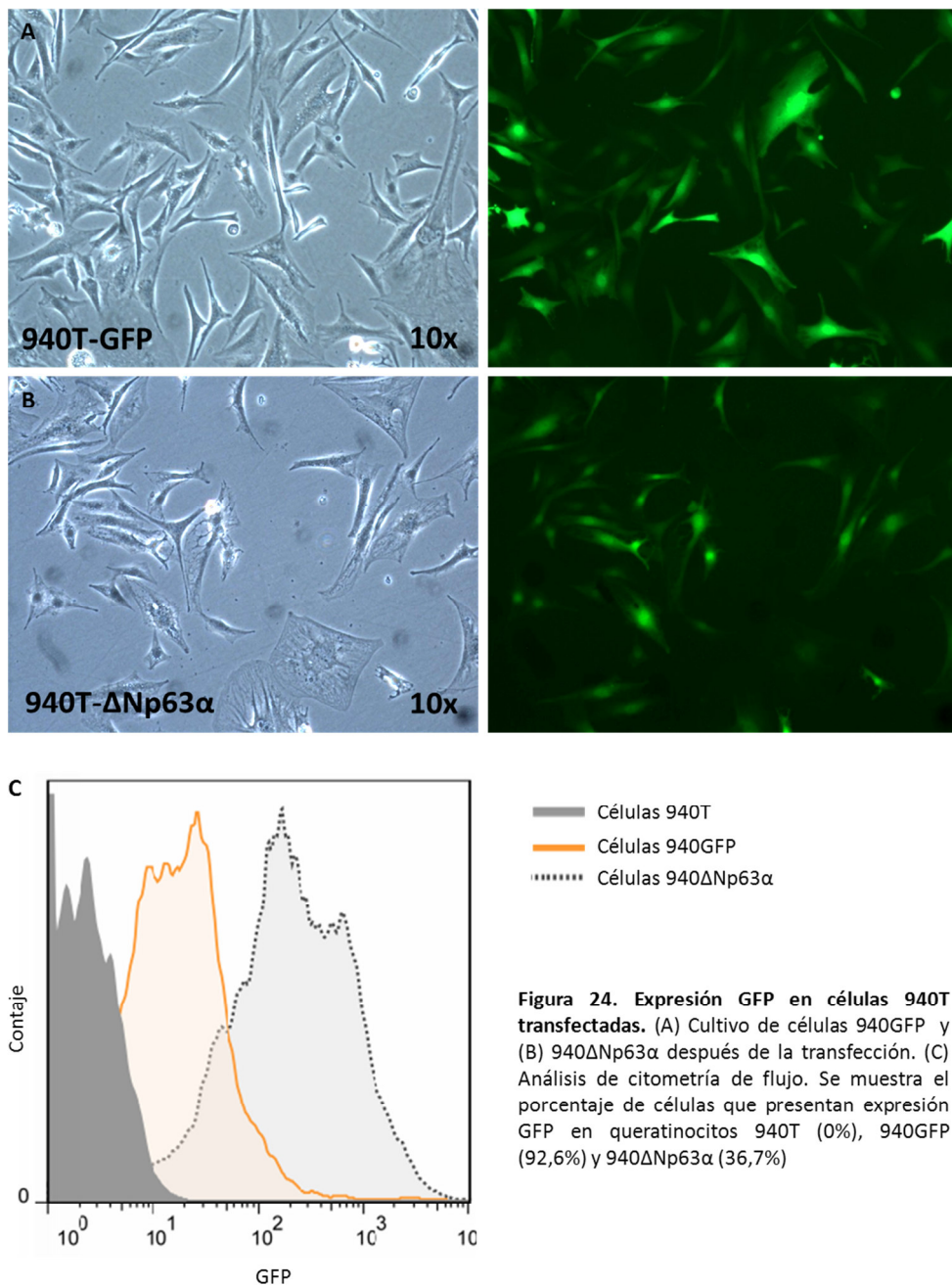




**Figura 23. Reactivación farmacológica de p63 en la línea tumoral 940T.** Expresión diferencial de  $\Delta Np63$  en las células CoCa y 940T tratadas con diversos inhibidores moleculares.

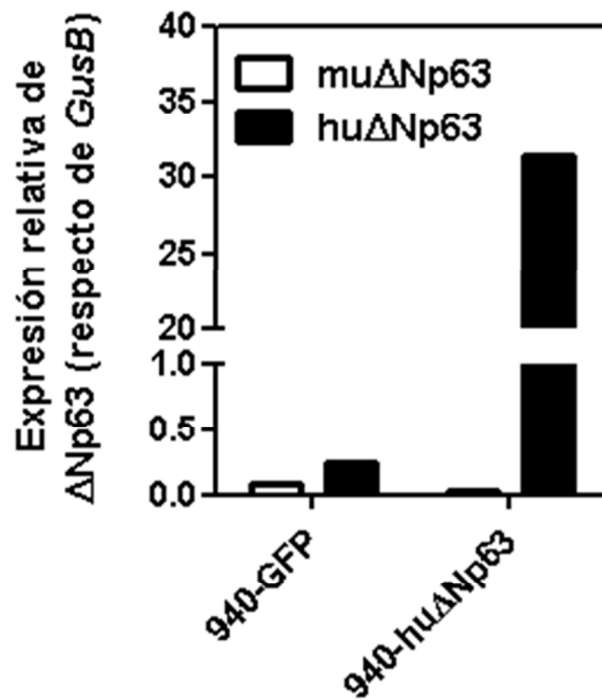
### 4.3. Consecuencias funcionales de la sobreexpresión de $\Delta Np63\alpha$ en células tumorales 940T.

Para analizar las posibles consecuencias funcionales de la expresión de  $\Delta Np63\alpha$  en células tumorales, nos propusimos forzar su expresión en células 940T. Para ello se realizaron diferentes experimentos de transfección en los que no se logró expresar la proteína de forma permanente utilizando diferentes protocolos de transfección y diversas construcciones plasmídicas. Consecuentemente, se construyó un lentivirus que expresaba la proteína humana  $\Delta Np63\alpha$  y la proteína verde fluorescente GFP (separadas mediante una secuencia IRES). Con esta construcción lentiviral se infectaron las células 940T empleando como control el vector lentiviral que expresa únicamente IRES-GFP. La expresión de GFP permite determinar el porcentaje de células transducidas mediante citometría de flujo (fig.24C) y su aislamiento mediante FACS. Así se obtuvieron cultivos provenientes de las infecciones de las células 940T con lentivirus que codifican para GFP (fig.24A) o  $\Delta Np63\alpha$  y GFP (fig.24B). De forma significativa, no se detectaron cambios importantes en la morfología celular como consecuencia de la expresión hu $\Delta Np63\alpha$  (fig.24 A, B).



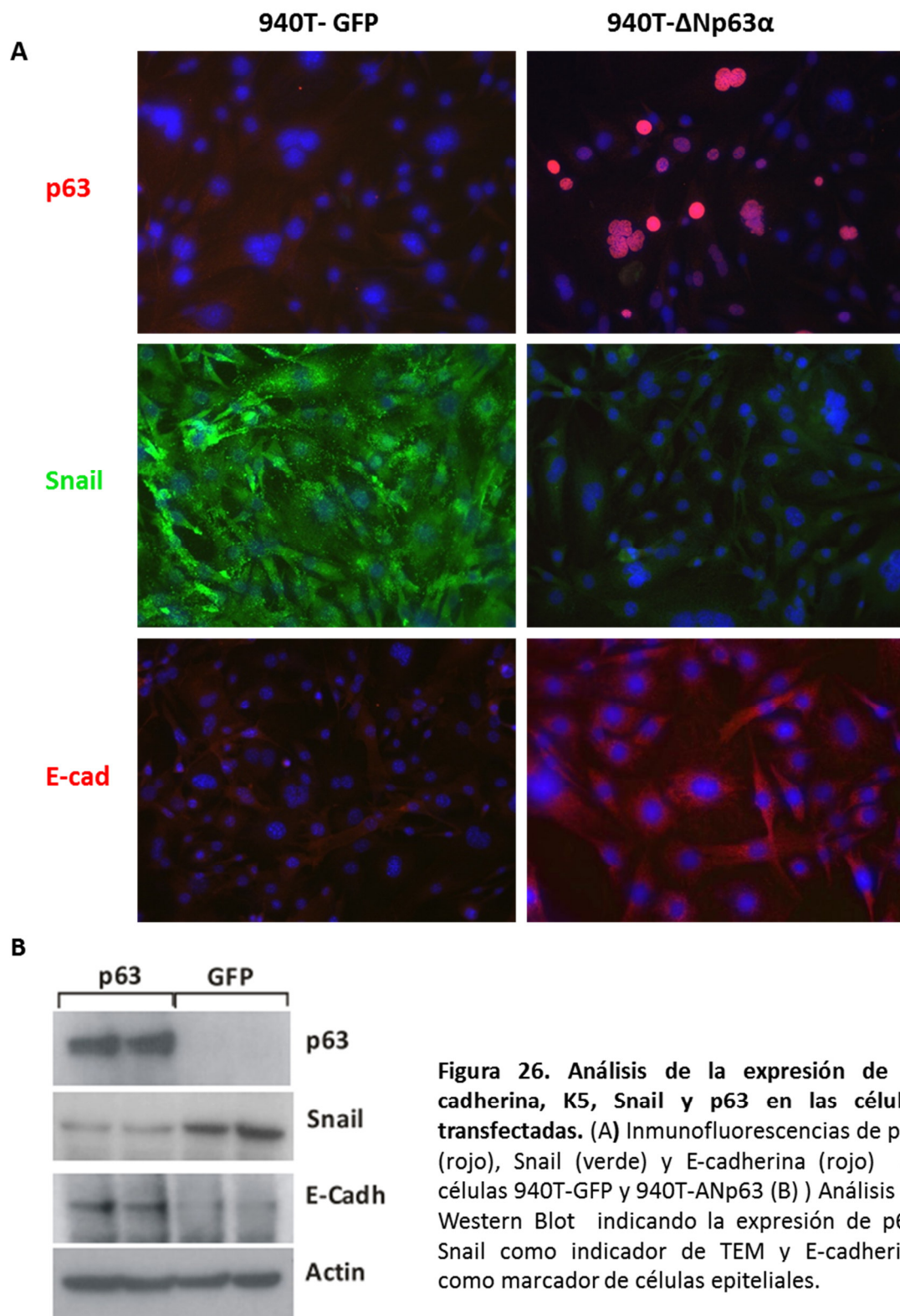
**Figura 24. Expresión GFP en células 940T transfectadas.** (A) Cultivo de células 940GFP y (B) 940ΔNp63α después de la transfección. (C) Análisis de citometría de flujo. Se muestra el porcentaje de células que presentan expresión GFP en queratinocitos 940T (0%), 940GFP (92,6%) y 940ΔNp63α (36,7%)

Mediante RTqPCR (fig.25) se comprobó la expresión de la proteína humana ΔNp63 en las células 940ΔNp63. En este mismo experimento, el empleo de cebadores específicos para p63 humana y de ratón nos permitió determinar que la expresión de la proteína transducida no conducía a cambios significativos en la proteína endógena.



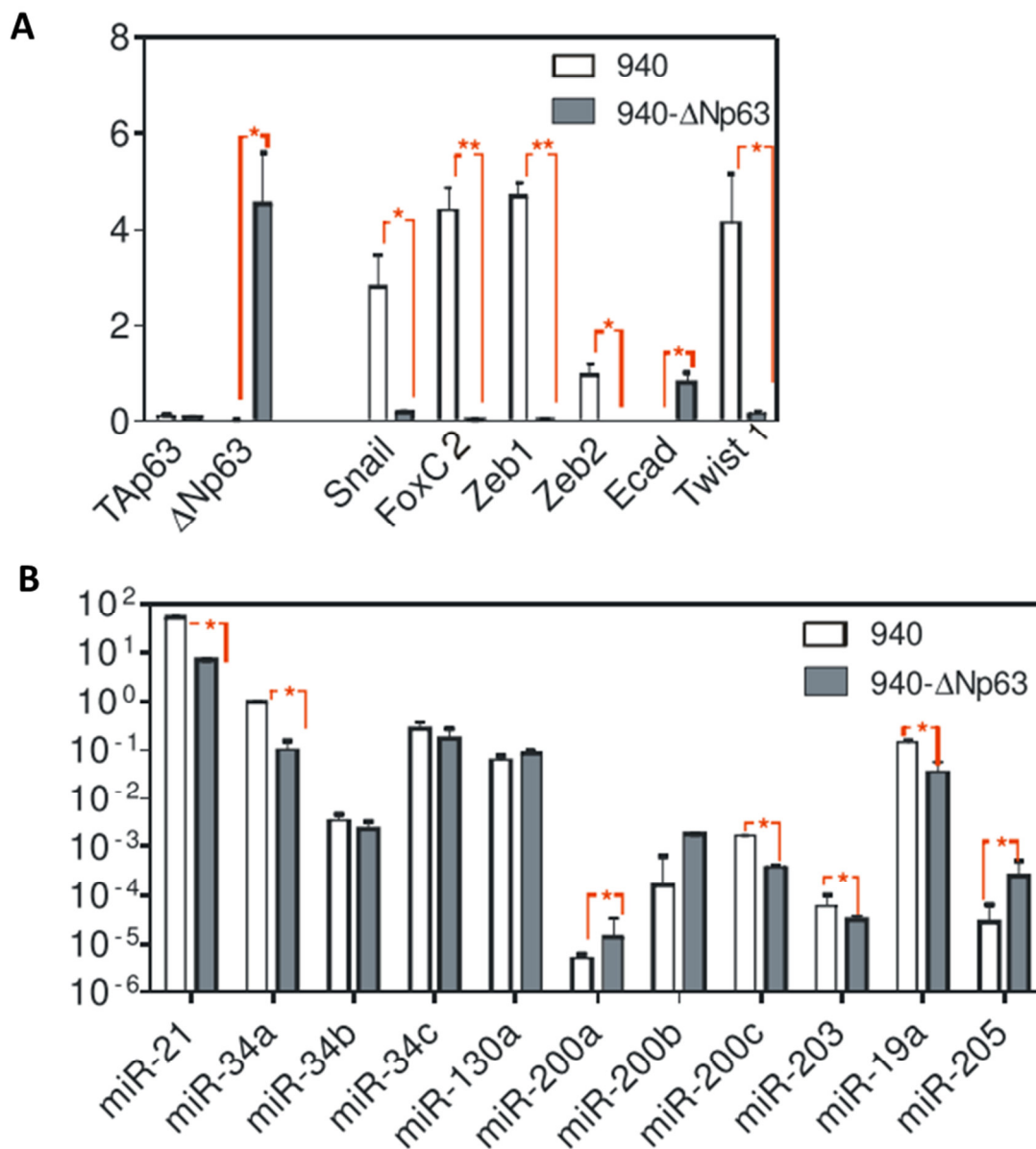
**Figura 25. Expresión de  $\Delta$ Np63 en células transfectadas y células 940TGFP.** RT-qPCR de la expresión de  $\Delta$ Np63 humano y murino en las células 940T- $\Delta$ Np63.

Por inmunofluorescencia se observó la expresión de p63 en las células 940T transducidas con hu $\Delta$ Np63 $\alpha$ , si bien no todas las células expresaban la proteína hu $\Delta$ Np63 $\alpha$  y existía una variabilidad en cuanto a los niveles expresados entre las células positivas. Además, estos estudios mostraron un aumento de expresión de E-cadherina en las células 940 $\Delta$ Np63 $\alpha$ , aunque ésta no se encontraba localizada correctamente en los contactos célula-célula sino que tenía una localización citoplasmática. Estos estudios también mostraron un descenso en la expresión de Snail (fig.26A). Estas observaciones se confirmaron mediante inmunoblot (fig.26B)



El silenciamiento del gen *Cdh1* (que codifica la E-cadherina) es un marcador precoz y un requisito para el proceso de TEM. Este evento es promovido por la acción concertada de diversos factores de transcripción como Snail, FOXC2, ZEB1, ZEB2 y Twist, que también se inducen en los tumores espontáneos desarrollados en los ratones *Trp53* <sup>$\Delta$ CE</sup> (fig.6 y 21, y Martínez-Cruz et al., 2009). Mediante RTqPCR, se observó que la expresión de hu $\Delta$ Np63 $\alpha$  en células 940T indujo una

disminución significativa en la expresión de todos estos factores de transcripción (fig.27A,B) con respecto a las células control, indicando que la expresión de p63 puede interferir con el proceso de TEM inhibiéndolo. Sin embargo, ninguno de estos genes se ha identificado por su unión a p63 en experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (Olsen et al., 2013; Testoni et al., 2006; Vigano et al., 2006; Yang et al., 2006; Su et al., 2010), lo que sugiere que la reducción observada no está directamente mediada por la unión de p63 a sus respectivos promotores. Adicionalmente, y como una posible alternativa que explique la reducción de la expresión de estos factores de transcripción, estudiamos la expresión de diversos microARNs que están implicados en el proceso de TEM mediante la modulación de dichos factores de transcripción (Brabletz, 2012; Gregory et al., 2008b; McConkey et al., 2009), o están regulados por p53 y/o p63 (Boominathan, 2010; Candi et al., 2015). Estos incluyen miR21, familia miR200, familia miR34, miR130a, miR203, miR19a y miR205. Se observó una reducción significativa en la expresión de miR21, miR34a, miR200c, miR203 y miR19a, mientras que miR200a, miR200b y miR205 mostraron una mayor expresión en células 940ΔNp63α (fig.29).

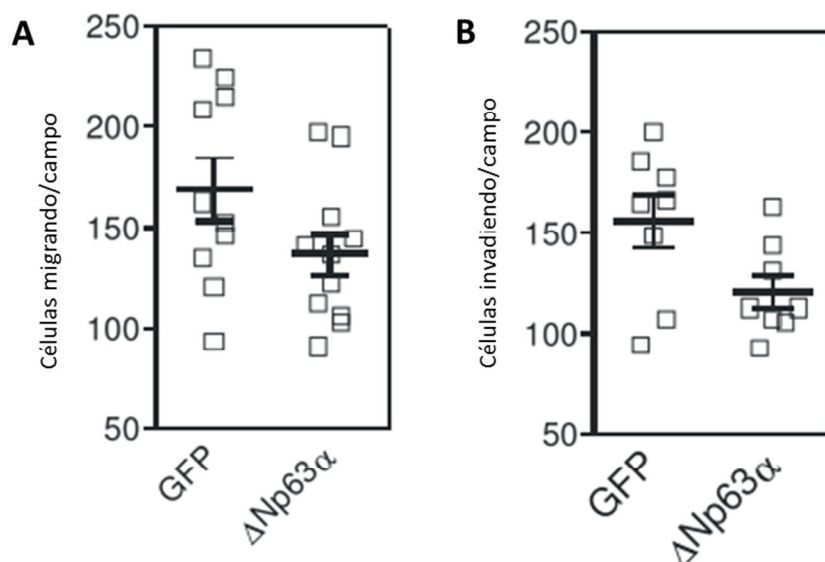


**Figura 27.** La expresión de  $\Delta Np63\alpha$  en las células 940 modifica la expresión de genes y microARNs implicados en el proceso de TEM.

Determinación de la expresión de factores de transcripción (A) y microARNs (B) por análisis de RT-qPCR en células 940 $\Delta Np63$  respecto a células control 940GFP. (\* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$ )

Es importante destacar que la inducción de *Cdh1*, miR200a, miR200b y miR205, así como la reducción en los niveles de *FoxC2*, *Snai1*, *Twist1*, *Zeb1*, *Zeb2*, miR21, miR19a y miR203, serían compatibles con una posible reducción en el potencial metastásico de células 940T por la expresión ectópica de hu $\Delta Np63\alpha$ . Para confirmar este aspecto realizamos, en primer lugar, un estudio de la migración e invasividad mediante cámaras de Boyden. Éste mostró que la expresión de hu $\Delta Np63\alpha$  produce una inhibición parcial de las capacidades migratoria (fig. 28A) e invasiva (fig. 28B) de las células 940T.



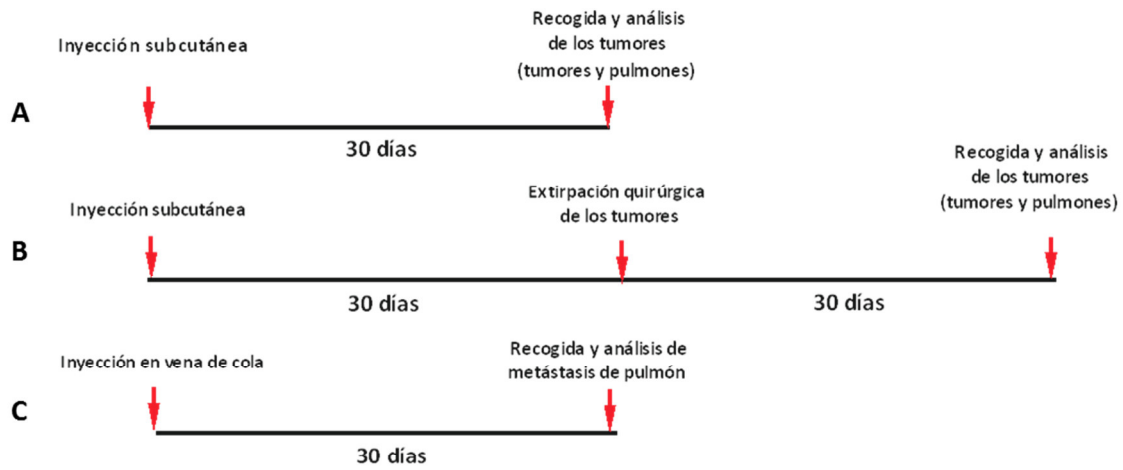


**Figura 28. Estudio de la capacidad migratoria e invasiva de las células 940 $\Delta Np63$  y 940GFP.** Análisis cuantitativo utilizando cámaras de Boyden para ensayos de capacidad migratoria (A) e invasiva (B) de células 940T-GFP y 940T- $\Delta Np63$ .

En conjunto, estos datos indican que la expresión forzada de p63 se opone a la TEM. Esto se debe, probablemente, a la modulación indirecta de la expresión de diversos factores de transcripción, posiblemente mediada por la regulación de diversos microARNs. No obstante, la expresión de p63 no es suficiente para revertir completamente este proceso, como se demuestra por la ausencia de cambios significativos en la morfología celular.

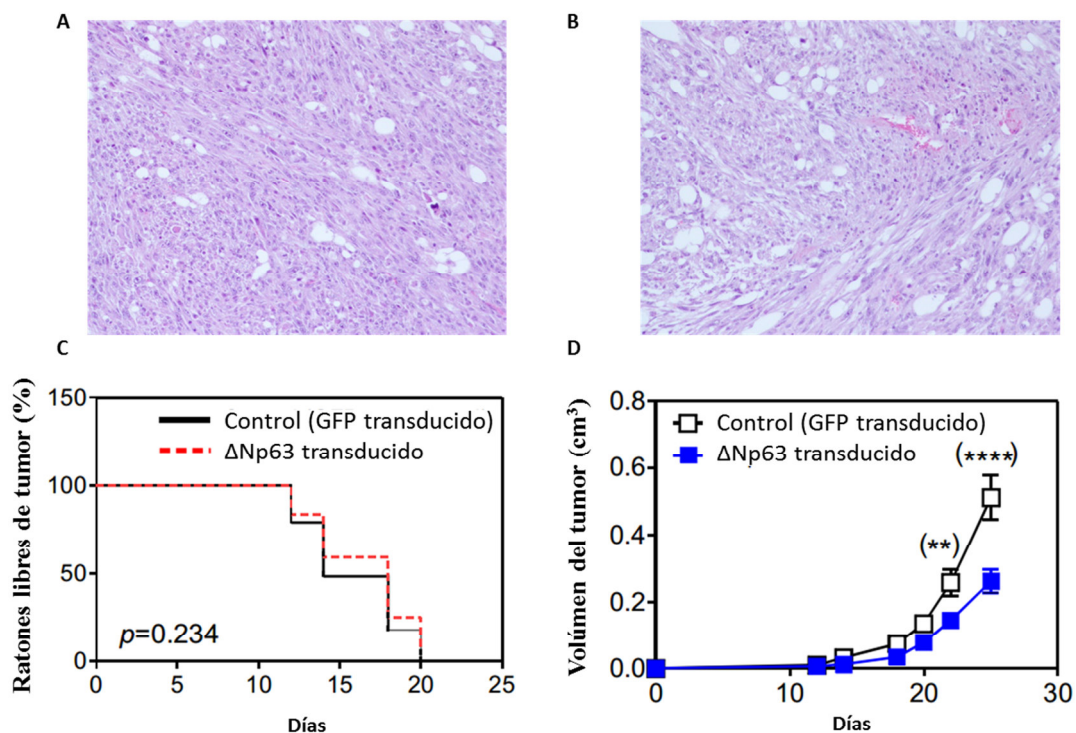
#### 4.4. Análisis *in vivo* de la capacidad tumorigénica de la sobreexpresión de $\Delta Np63$ en células tumorales 940T

Con el propósito de conocer *in vivo* el potencial de p63 de modular la capacidad tumorigénica y metastática de las células 940T se realizaron diferentes aproximaciones experimentales (fig.30). En primer lugar se inyectaron por vía subcutánea células 940GFP y 940 $\Delta Np63\alpha$  en ratones atímicos *nu/nu*. En una primera serie de estos animales (n=5 para células control y 940 $\Delta Np63\alpha$ , respectivamente), se observó el crecimiento tumoral y a los 30 días se sacrificaron, analizándose simultáneamente los tumores y los pulmones inmediatamente después de su sacrificio (fig.29A). En una segunda cohorte (n=5 para células control y 940 $\Delta Np63\alpha$ , respectivamente) los tumores subcutáneos se eliminaron quirúrgicamente y los ratones fueron sacrificados 30 días después para el análisis de posibles metástasis pulmonares (fig.29B). Finalmente, también se inyectaron células control y 940 $\Delta Np63\alpha$  en la vena de la cola de ratones atímicos *nu/nu* (n=5 para ambas células) recogiendo los pulmones para su posterior análisis (fig.29C).



**Figura 29. Esquema del ensayo *in vivo* realizado en ratones atímicos *nu/nu*.** En las inyecciones por vía subcutánea (A y B) se inyectaron  $10^5$  células/flanco y en las inyecciones por vía intravenosa (C)  $10^4$  células.

En la primera aproximación se observó que los tumores de los animales inyectados por vía subcutánea con células 940 $\Delta$ Np63 $\alpha$  no mostraban diferencias significativas en el grado de diferenciación (fig.30A,B) ni en el tiempo de aparición (fig.30C) con respecto a los inyectados con células control. No obstante, se apreció un menor crecimiento del tamaño tumoral en los animales inyectados con células 940 $\Delta$ Np63 $\alpha$  que en los animales inyectados con células control (fig.30D).

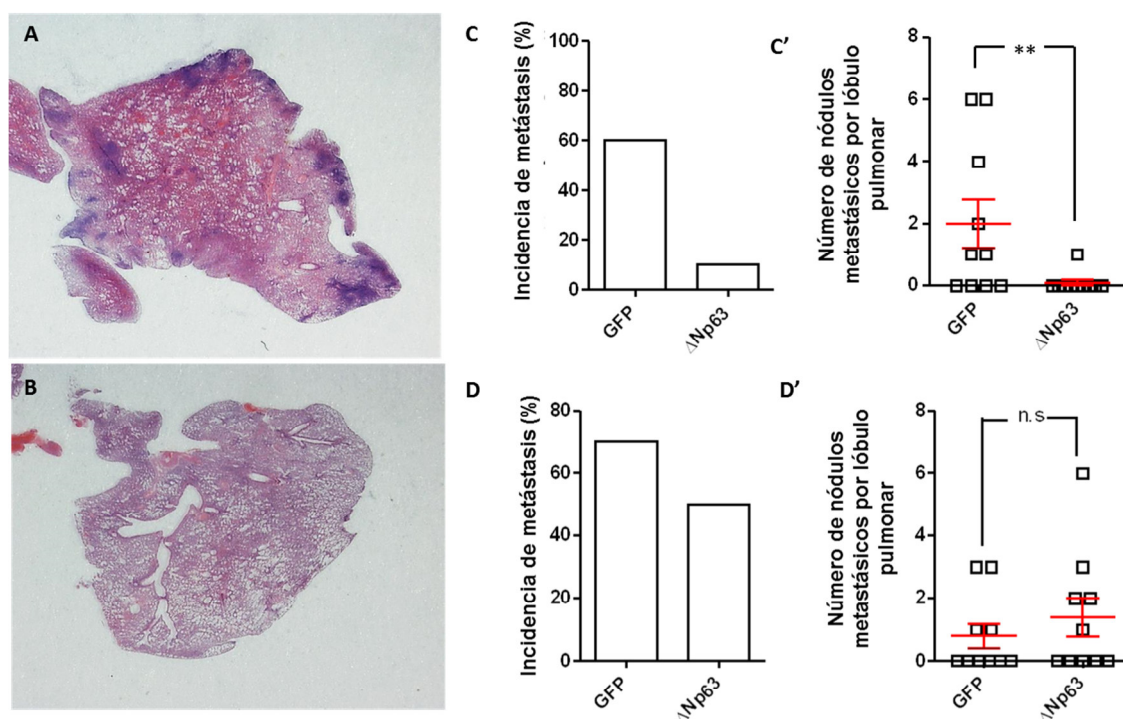


**Figura 30. Estudio del crecimiento tumoral de ratones desnudos inyectados en flanco.** H/E de tumores de ratones desnudos inyectados por vía subcutánea con células 940GFP (A) y 940 $\Delta$ Np63 $\alpha$  (B). (C) Gráfica de Kaplan-Meier que representa el momento de aparición de tumores después de la inyección subcutánea de células 940GFP y 940 $\Delta$ Np63. (D) Representación gráfica que muestra el crecimiento tumoral tras la inyección subcutánea de las células indicadas. (\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ )



Los pulmones de los ratones inyectados por vía subcutánea con células 940 $\Delta$ Np63 $\alpha$  (fig.31B) presentaban menos nódulos metastásicos que los pulmones inyectados con células 940T-GFP (fig.31A).

Además, la incidencia de metástasis en los ratones sacrificados 30 días después de la inyección subcutánea (fig.31C) y de los ratones operados y sacrificados posteriormente (fig.31D) mostró que la expresión de  $\Delta$ Np63 $\alpha$  en las células 940T producía una disminución en la incidencia de lesiones metastásicas, si bien esta es menos apreciable en los animales previamente operados. Asimismo, el número de focos metastásicos solo aparecía disminuido significativamente en el primer grupo de animales (fig.31C').



**Figura 31. Estudio de los pulmones de ratones inyectados subcutáneamente**  
H/E de pulmones de ratones nude inyectados subcutáneamente con células (A) 940T-GFP y (B) 940T- $\Delta$ Np63. Incidencia de metástasis (C y D) y número de nódulos metastásicos por lóbulo pulmonar (C' y D') de ratones sacrificados 30 días tras la inyección subcutánea de células (C y C') y operados a los 30 días y sacrificados 30 días después (D y D'). (\*\*p<0,01 y n.s. p>0,1).

La formación de metástasis a partir de un tumor primario conlleva diversas fases tales como invasión, extravasación, supervivencia en el torrente, extravasación y formación de focos en pulmón. Con el fin de determinar si la expresión de p63 afecta a las últimas fases de este complejo proceso, inyectamos células 940GFP y 940 $\Delta$ Np63 $\alpha$  en vena de cola de ratones inmunodeficientes recogiendo los pulmones un mes más tarde. El análisis de cortes histológicos (fig.32A,A') demostró una incidencia similar en ambos grupos (fig.32B), si bien el número de nódulos de metástasis se veía drásticamente reducido en el caso de la inyección de células 940 $\Delta$ Np63 $\alpha$  (fig.32C). Además, el cálculo del porcentaje de la superficie pulmonar cubierta por

nódulos de desarrollo metastásico también se encontraba disminuido (fig.32D), indicando que estos nódulos eran menores en el caso de las células 940 $\Delta$ Np63 $\alpha$ .

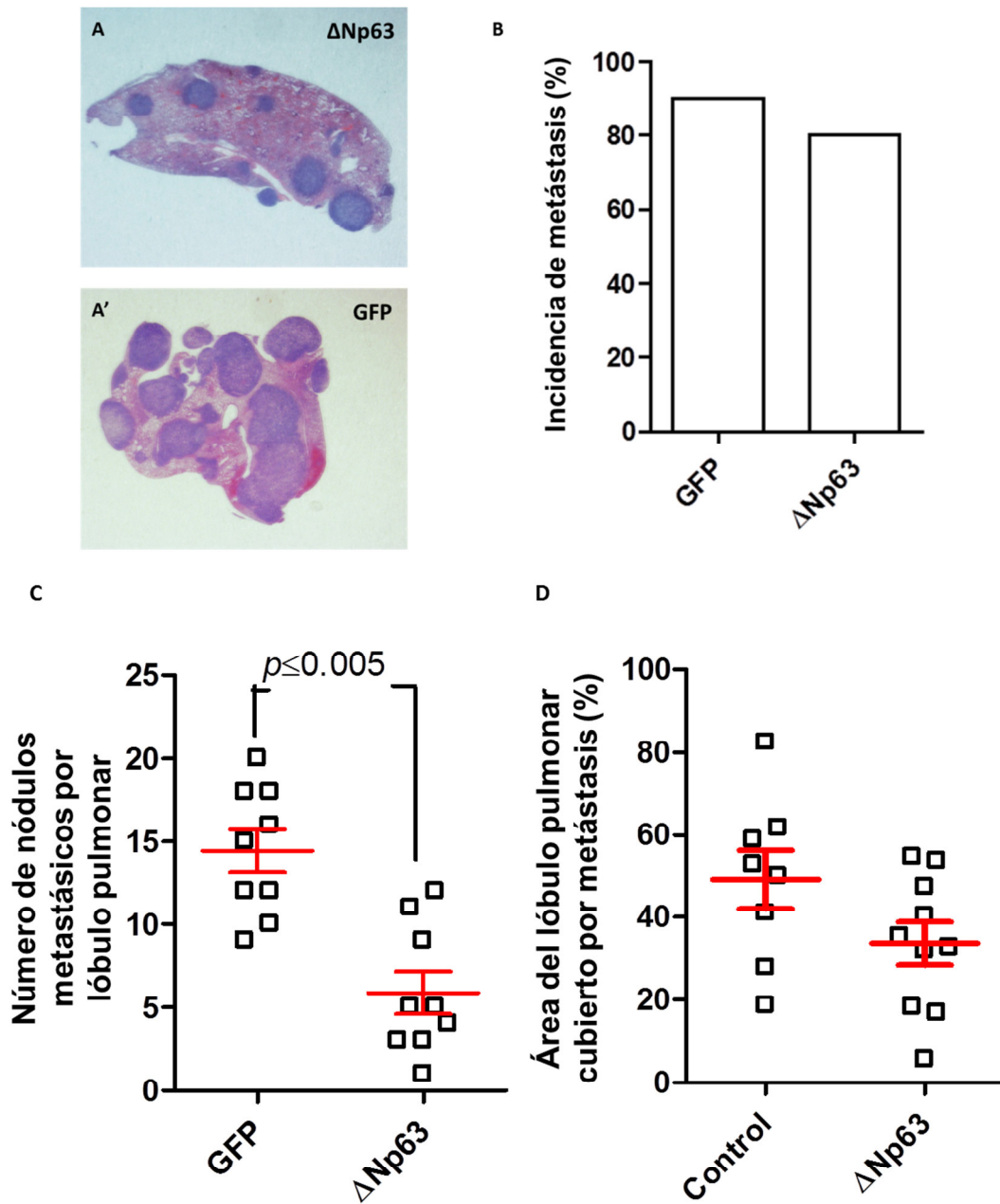


Figura 32. La expresión de  $\Delta$ Np63 $\alpha$  disminuye el desarrollo de metástasis. H/E de cortes histológicos de pulmones de animales inyectados en vena de cola con células 940 $\Delta$ Np63 (A) y 940GFP (A').

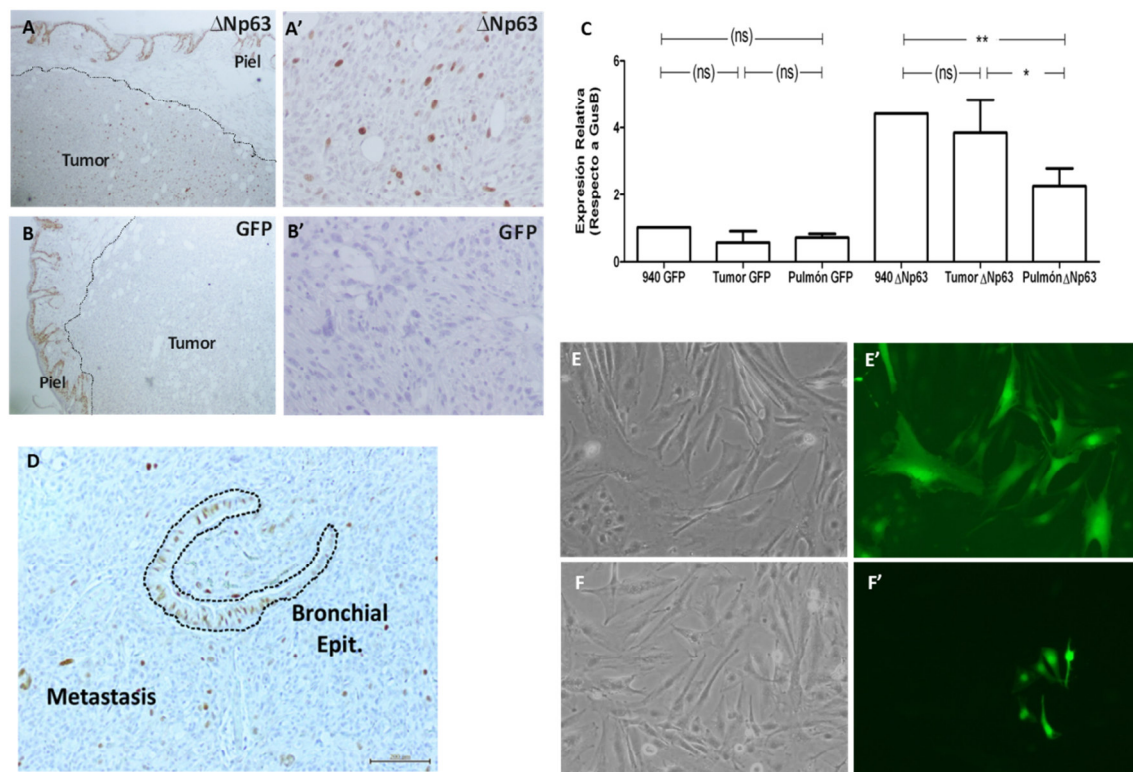
(B) Porcentaje de pulmones con desarrollo de metástasis.

(C) Número de nódulos metastásicos por lóbulo pulmonar de ratones inyectados en vena con células 940GFP y 940 $\Delta$ Np63.

(D) Área de los lóbulos pulmonares ocupados por los nódulos metastásicos.

En conjunto, estos datos podrían indicar que la expresión forzada de p63 solo conduce a un retraso en el desarrollo metastásico que afectaría tanto a las etapas iniciales (migración y extravasación) como finales (formación de focos en el tejido diana) del proceso.

A continuación analizamos la expresión de p63 por medio de técnicas inmunohistoquímicas donde se detectó, como era esperable, su expresión únicamente en los tumores procedentes de la inyección de células 940 $\Delta$ Np63 $\alpha$ . Sin embargo, esta expresión no era generalizada en el tumor, y solo algunas células expresaban la proteína transducida (fig.33A,B). Para corroborar esta observación, analizamos mediante RT-qPCR la expresión de  $\Delta$ Np63 $\alpha$  de las células transducidas, los tumores subcutáneos desarrollados y los pulmones con metástasis. Los datos obtenidos demuestran una reducción en los tumores en comparación con las células, que se reducía aún más en los pulmones (fig.33C). De forma análoga, la expresión de la proteína transducida en las lesiones metastásicas de los pulmones de los animales inyectados en vena de cola con las células 940 $\Delta$ Np63 $\alpha$  era reducida (fig.33D). Estos resultados sugieren que la expresión de la proteína transducida se pierde con el tiempo. De forma análoga el número de células con expresión de GFP *in vitro* también se ve reducida con los sucesivos pases (fig.33E,E'). Esta disminución se debe probablemente al silenciamiento del transgén viral e indica que la expresión de p63 podría ser deletérea para las células 940T. Por otro lado, el hecho de que la disminución sea observable *in vitro*, también sugiere que la disminución observada no se debe a procesos no autónomo celulares que podrían tener lugar *in vivo*.



**Figura 33. La expresión de  $\Delta$ Np63 se reduce en tumores y pulmones.**

(A, A') Tinción de inmunohistoquímica de la expresión de p63 en los tumores subcutáneos producidos por la inyección de células 940T- $\Delta$ Np63 $\alpha$ . (B, B') Tinción de inmunohistoquímica de la expresión de p63 en los tumores subcutáneos producidos por la inyección de células 940T. (C) Expresión relativa de p63 en muestras de tumores y pulmones de ratones inyectados con células 940T-GFP y 940T- $\Delta$ Np63 frente a las células correspondientes (\*p=0,0130; \*\*p=0,0027). (D) Tinción de inmunohistoquímica de la expresión de p63 en las metástasis pulmonares producidas por la inyección en vena de cola de células 940-hu $\Delta$ Np63 $\alpha$ . (E) Imagen al microscopio de las células 940GFP en cultivo y (E') su expresión de GFP. (F) Imagen microscopio de las células 940 $\Delta$ Np63 en cultivo y (F') su expresión de GFP un mes después de la transfección.

Los resultados, en su conjunto, demuestran que la expresión de  $\Delta Np63\alpha$  en las células deficientes en p53 reduce parcialmente el comportamiento metastásico, probablemente a través de la modulación de la expresión de genes y microARNs que intervienen en el proceso de TEM. Sin embargo, no podemos descartar que la inhibición de la capacidad metastásica como consecuencia de la expresión forzada de p63 sea mucho más relevante, pero el silenciamiento de su expresión nos impide determinar su magnitud en términos reales.

## 5. Caracterización del modelo múrido deficiente en los miembros de la familia retinoblastoma en epitelios estratificados.

Estudios previos de nuestro grupo han mostrado la existencia de un eje funcional que conecta a la familia de pRb con p53 en epitelios estratificados, y que la eliminación de los tres miembros es suficiente para el desarrollo tumoral en otros tejidos (vejiga). Sin embargo, cómo afecta la pérdida de los tres miembros de la familia Rb en epidermis es un evento desconocido. Por lo tanto, nos propusimos analizar las consecuencias de la eliminación simultánea de todos los miembros de la familia retinoblastoma en las células basales de epitelios estratificados de ratones adultos de forma inducible mediante la generación del modelo múrido  $Rb1^{F/F};Rbl2^{F/F};Rbl1^{-/-};K14cre^{ERT2}$  (TKO) y determinar la posible interferencia con la activación funcional de p53.

Datos anteriores de nuestro grupo en animales  $Rb^{F/F};K14cre^{ERT2}$ , tanto en fondo  $Rbl1^{-/-}$  como en  $E2F1^{-/-}$  (Costa et al., 2013b; Costa et al., 2012), habían demostrado: 1) que el tratamiento tópico con Tamoxifeno atravesaba la barrera epidérmica y se repartía homogéneamente por el organismo, observándose un efecto similar con Tamoxifeno y su forma activa 4OH-Tamoxifeno (que se produce por hidroxilación hepática) incluso en zonas lejanas al punto de aplicación; 2) que las dosis reportadas en la literatura (20mg/aplicación durante 5 aplicaciones) eran suficientes para inducir la recombinación y la posterior aparición de fenotipo en los animales tratados con Tamoxifeno, pero no con el vehículo sólo. En consecuencia, decidimos emplear estas mismas condiciones en animales  $Rb1^{F/F};Rbl2^{F/F};Rbl1^{-/-};K14cre^{ERT2}$ .

### 5.1. Inducción de la recombinación mediada por tamoxifeno por aplicación tópica

El tratamiento tópico de una primera cohorte de 5 animales  $Rb1^{F/F};Rbl2^{F/F};Rbl1^{-/-};K14cre^{ERT2}$ , en adelante TKO, con Tamoxifeno en las condiciones 25 mg de Tamoxifeno de forma localizada en

el dorso del animal 5 días consecutivos, condujo a un deterioro muy rápido y a la muerte de los animales. Esta ocurría invariablemente entre 1 y 2 semanas tras la aplicación de tamoxifeno y por causas desconocidas. Por tanto, decidimos disminuir la dosis hasta conseguir unas condiciones experimentales que nos permitiesen observar la evolución fenotípica de los animales.

Tras un estudio detallado de dosis y número de aplicaciones tópicas (tabla 1), se seleccionó una única aplicación tópica de 1 mg de Tamoxifeno (Kataoka et al., 2008) que resultó compatible con una supervivencia de 3 a 6 meses.

Dosis TMX	Nº aplicaciones	Nº de animales tratados (N)	Letalidad
25 mg	5	5	5-11 días
25 mg	2	4	13-28 días
25 mg	1	3	28 días
10 mg	1	3	30-32 días
1 mg	5	4	7-15 semanas
1 mg	1	15	3-6 meses

**Tabla1.** Relación de tratamientos experimentales de TMX llevados a cabo en animales TKO y la letalidad observada por los mismos.

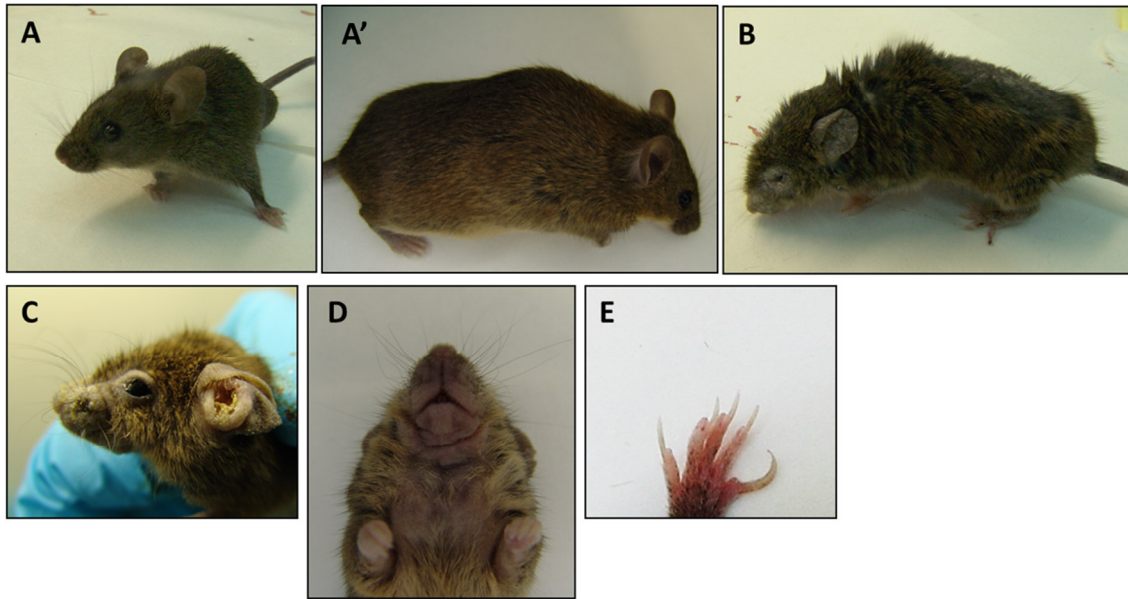
Estos datos indican que la eliminación de los tres miembros de la familia Rb en epitelios estratificados, incluso en edad adulta es incompatible con la supervivencia del animal. No obstante, desconocemos cuál de los tejidos donde se expresa el transgén K14Cre es el responsable de esta letalidad.

## 5.2. Fenotipo externo de los animales TKO tras el tratamiento con tamoxifeno.

A partir de los dos meses tras la aplicación de tamoxifeno se observó que los animales TKO presentaban un fenotipo progresivo con zonas de alopecia, pérdida de peso y un engrosamiento general de la piel (fig.37B), más acusado en zonas periorales (hocico, labio) (fig.37C,D), orejas y párpados (fig.37C). Además se observó onicogriposis (crecimiento anormal de las uñas) (fig.37E) y formación de costras en la piel, posiblemente debida a la acumulación de células muertas, que en

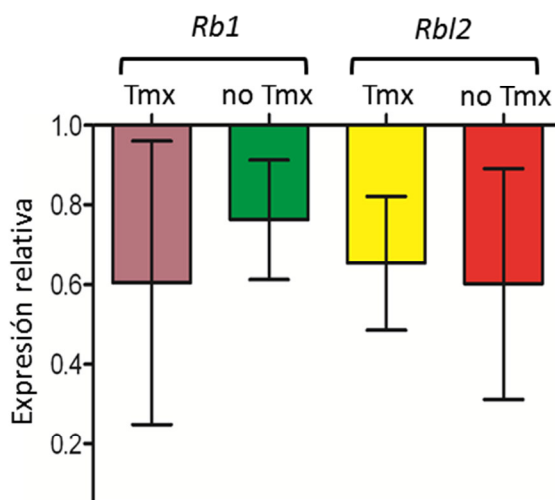


conjunto revelaba un fenotipo similar al observado en los animales  $Rb^{\Delta ind}; p107^{-/-}$  (Costa et al., 2012).



**Figura 37.** Aspecto externo de animales  $Rb^{\Delta ind}; p107^{-/-}; p130^{\Delta ind}$  tras el tratamiento con 1mg tamoxifeno. A y A') Animal control. B)  $Rb^{\Delta ind}; p107^{-/-}; p130^{\Delta ind}$  (TKO). C) Aspecto del rostro de animal TKO. D) Zona ventral del cuello de animal TKO. E) Uñas con crecimiento alterado de animal TKO.

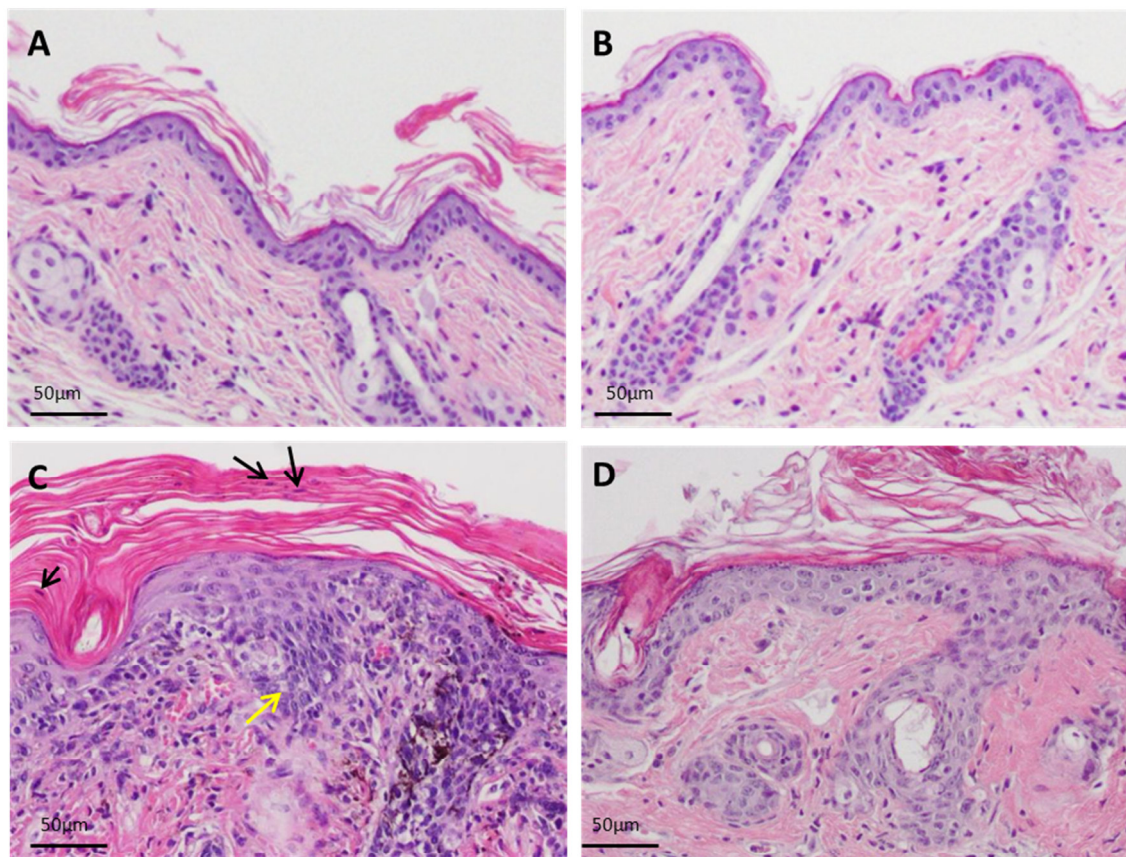
De acuerdo con nuestros datos anteriores (Costa et al., 2013b; Costa et al., 2012), observamos que los efectos fenotípicos no se limitaban únicamente a la zona de aplicación de tamoxifeno. Mediante RTqPCR se comprobó que la recombinación de los alelos floxeados *Rb1* y *Rb12*, conducía a una disminución significativa de su expresión, tanto en zonas de piel dorsal (de tratamiento directo con el tamoxifeno, a partir de ahora piel TMX) como en otras zonas no tratadas del animal (a partir de ahora piel no TMX), con respecto a lo observado en pieles de animales control ( $Rb1^{F/F}; Rb12^{F/F}; Rb11^{-/-}$ ) tratados con TMX (fig.38).



**Figura 38.** Representación gráfica de la disminución de la expresión de *Rb1* y *Rb12* en pieles del lomo de animales TKO. Análisis de RT-qPCR de pieles Tmx y no Tmx tomadas de los mismos animales y referidas a pieles de animales control. (n=5).

### 5.3. Caracterización de la piel en animales TKO

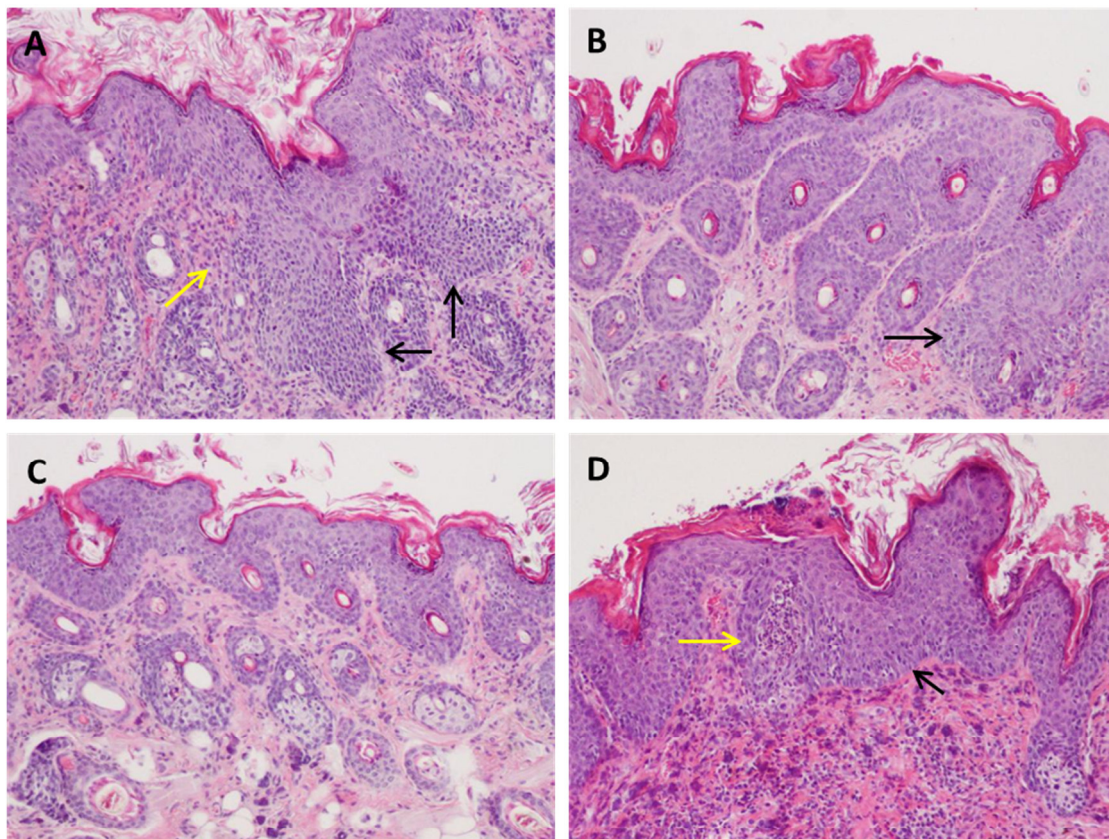
Los estudios histológicos de las pieles revelaron una hiperplasia elevada tanto en piel TMX como en pieles alejadas de la zona de tratamiento. También se observaron fenómenos de paraqueratosis e hiperqueratosis y desarrollo de carcinomas *in situ* principalmente y más acusados en pieles TMX (fig.39C).



**Figura 39. H&E mostrando pieles de animales TKO.** (A) Piel TMX (lomo) de animal control. (B) Piel no TMX (ventral) de animal control. (C) Piel TMX de animal TKO (las flechas negras indican paraqueratosis y la flecha amarilla carcinoma *in situ*). (D) Piel no TMX (ventral) de animal TKO.

Estas mismas alteraciones se observaron en pieles de otras localizaciones como hocico, orejas, labio o párpados, incluyendo en algunos casos, desarrollo de carcinomas (hocico y oído (fig.40A y D)).

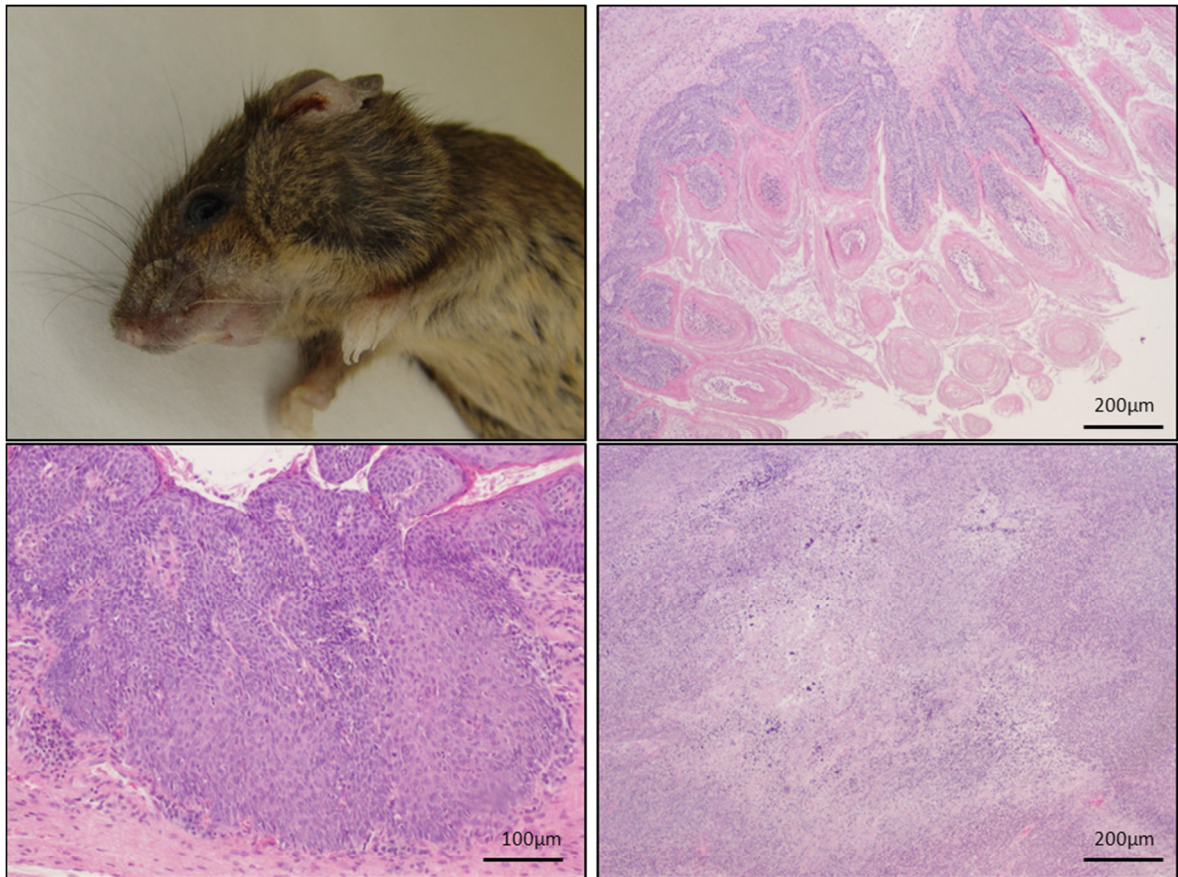




**Figura 40. H&E de epitelios de animales TKO.** (A) Oreja. (B) Labio. (C) Párpado. (D) Hocico. (las flechas negras indican zonas de displasia y las amarillas carcinoma in situ).

Además, durante la necropsia de los animales TKO se observó un alto número de procesos inflamatorios en los conductos auditivos. Mediante análisis histológicos se apreciaron grandes áreas de necrosis con abundantes neutrófilos degenerados, así como calcificaciones en el interior de los conductos auditivos externos. Estos hallazgos son compatibles con el desarrollo de otitis externa, posiblemente debida a la obstrucción del conducto auditivo por la fuerte hiperplasia desarrollada en el tejido epitelial. Además, se detectó una marcada hiperplasia e hiperqueratosis en la epidermis que recubre dicho conducto, observándose en algunos casos el desarrollo de carcinomas escamosos (fig.41).

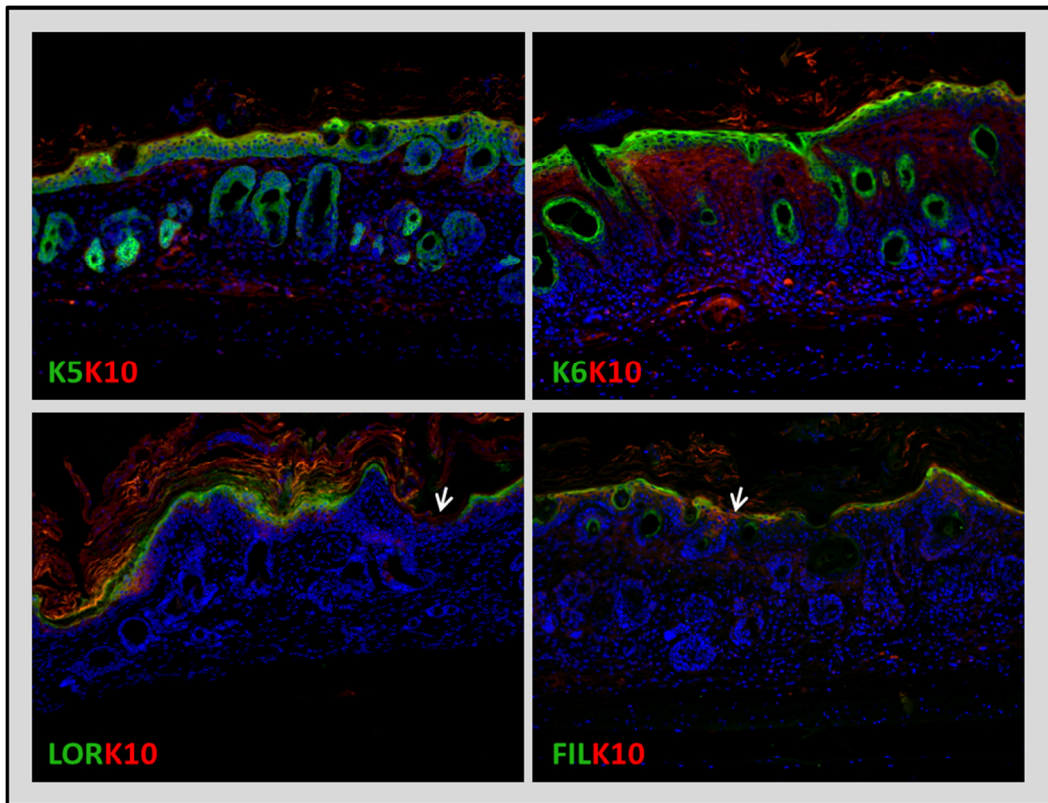
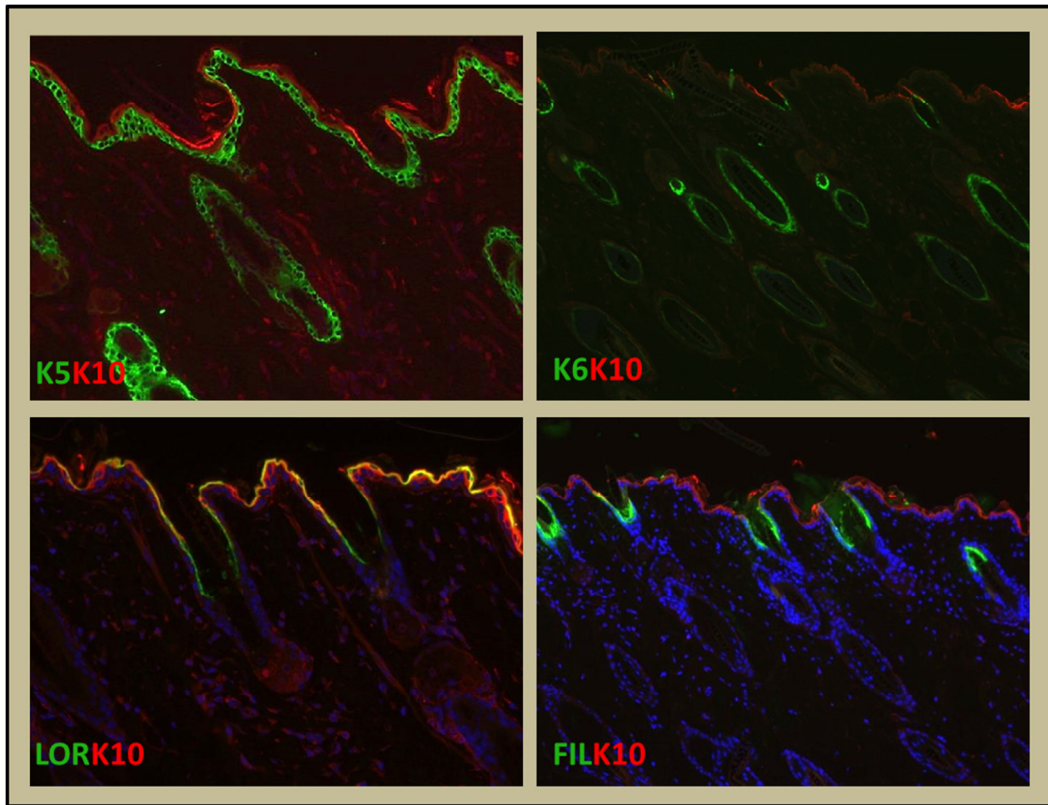




**Figura 41. Desarrollo de carcinomas en el epitelio de la cavidad auditiva.** (A) Animal con desarrollo de otitis. (B) Hiperplasia e hiperqueratosis (H&E). (C) H&E del conducto auditivo que presenta el desarrollo de un carcinoma. (D) Zona de necrosis mostrada en una H&E.

### 5.3.1. Diferenciación y proliferación epidérmica

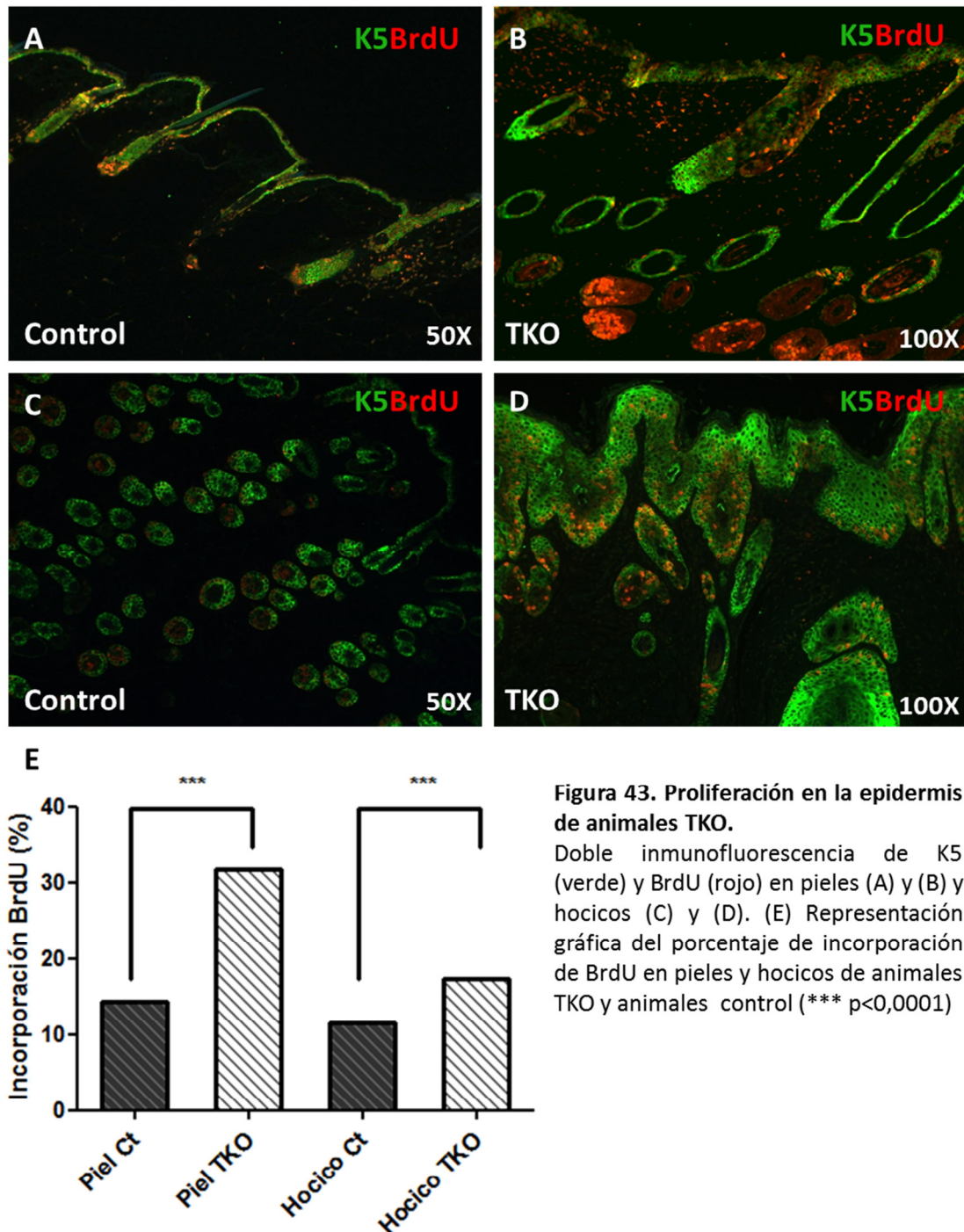
Para determinar posibles alteraciones en la diferenciación epidérmica, se llevó a cabo un análisis por inmunofluorescencia de cortes de piel empleando anticuerpos frente a diferentes queratinas. La queratina K5 presentó un patrón de expresión expandido hacia capas suprabasales donde se co-expresaba con la queratina K10 (fig.42). Por otro lado, se observó inducción de la expresión de queratina K6 en zonas de piel interfolicular (fig.42), lo que, junto con la hiperplasia que presenta la epidermis de estos animales, sugiere un aumento en la proliferación de la epidermis. También se observaron alteraciones en la expresión de los marcadores de diferenciación terminal, con áreas donde la expresión de loricrina y filagrina parece desaparecer (fig.42).



**Figura 42. Caracterización de la diferenciación en epidermis de ratones TKO.** Dobles inmunofluorescencias de marcadores de proliferación K5 y K6 (rojo), diferenciación temprana K10 (verde) y diferenciación terminal loricrina y filagrina (verde). DAPI reconoce los núcleos en azul. Imagen superior pieles de animales control. Imagen inferior pieles de animales TKO. (las flechas blancas indican zonas de pérdida de expresión de loricrina y filagrina). El recuadro superior muestra las tinciones en pieles de animales control y el recuadro inferior de pieles de animales TKO.



Por otro lado, para caracterizar la proliferación en la epidermis de estos ratones se realizó un análisis de incorporación de BrdU. Como se muestra en la figura 43, la inactivación de los tres genes de la familia Rb, conduce a un aumento muy significativo de la incorporación de BrdU con respecto a los animales control (fig.43A,C,E), tanto en zonas tratadas (fig.43B,E) como no tratadas con Tamoxifeno, como el hocico (fig.43D,E).



**Figura 43. Proliferación en la epidermis de animales TKO.**

Doble inmunofluorescencia de K5 (verde) y BrdU (rojo) en pieles (A) y (B) y hocicos (C) y (D). (E) Representación gráfica del porcentaje de incorporación de BrdU en pieles y hocicos de animales TKO y animales control (\*\*\*)  $p < 0,0001$

La capacidad de los genes de la familia Rb de reprimir la proliferación, depende de su facultad de unirse e inhibir factores de transcripción de la familia E2F (Hurford et al., 1997).

Mediante RT-qPCR se comprobó la variación de los niveles de expresión génica que presentaban los factores E2F en las pieles de animales TKO (fig.44), con respecto a animales control.

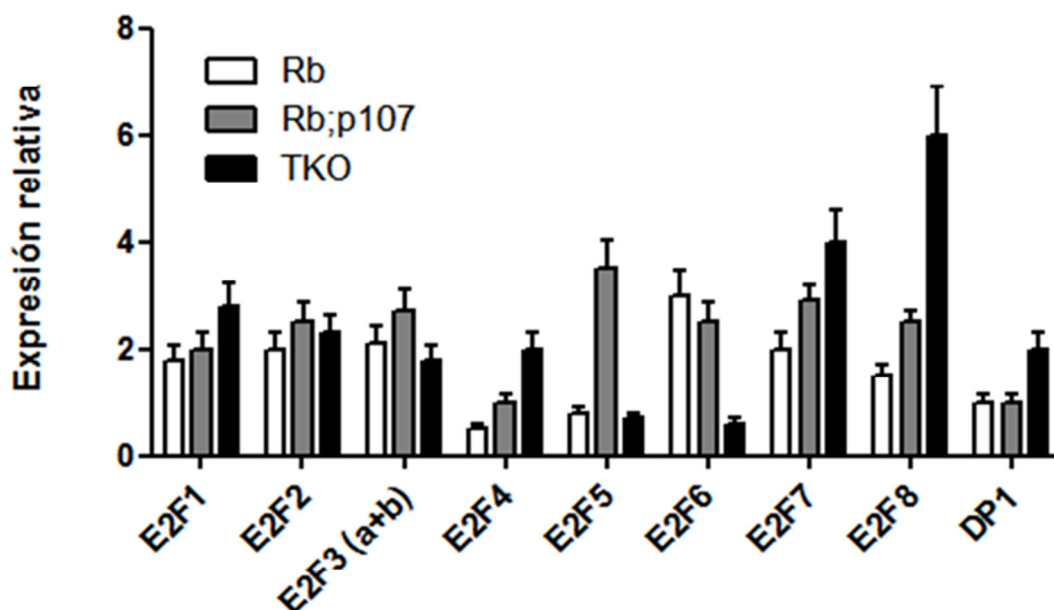
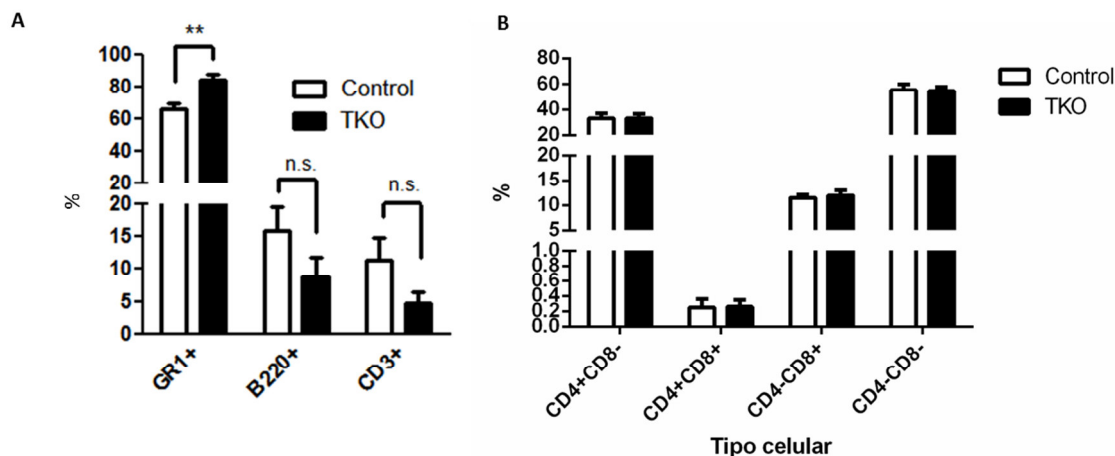


Figura 44. Representación de la variación de la expresión relativa de los miembros de la familia E2F obtenido a partir de ARN de pieles  $Rb^{\Delta Ind}$ ,  $Rb^{\Delta Ind};p107^{-/-}$  y TKO con respecto a las pieles control.

#### 5.4. Efecto de la eliminación de los genes de la familia retinoblastoma en timo

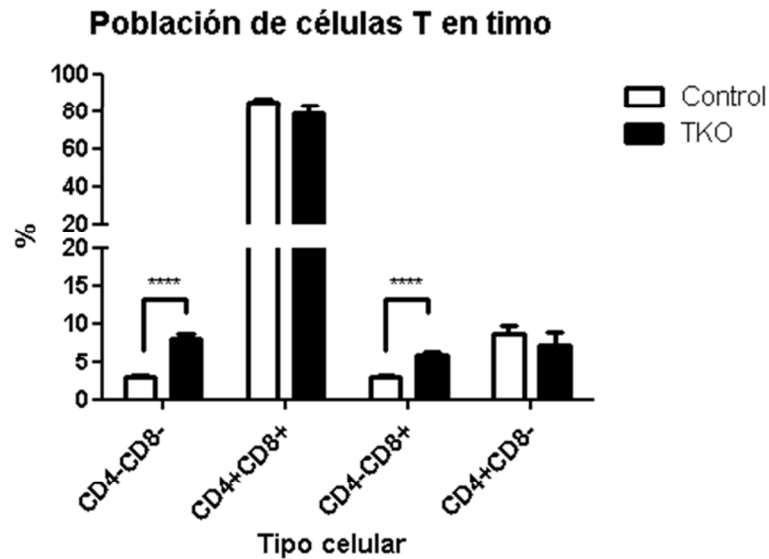
El timo presenta células epiteliales en la médula que expresan la queratina K14. Este órgano desempeña un papel fundamental en el sistema inmunológico como centro de la producción y maduración de células T. Además estos procesos dependen de forma intrínseca de la interacción entre los linfocitos inmaduros con las células epiteliales (Xing and Hogquist, 2014). La maduración de las células T precursoras sucede en la corteza tímica, donde comienza el proceso de diferenciación hacia timocitos CD4 y CD8 negativos (CD4-/CD8-), que posteriormente adquieren ambos marcadores (CD4+/CD8+). En una etapa final, en la médula, los timocitos expresan uno solo de los dos marcadores (CD4+/CD8- y CD4-/CD8+). El timo crece rápidamente durante la vida temprana, generando gran cantidad de células T tras lo cual, entra en un proceso de involución. Dado que la expresión de Cre viene mediada por el promotor de la queratina K14, decidimos analizar si el efecto sistémico producido por la administración tópica de tamoxifeno, podría afectar a este órgano.

Se analizó la posible alteración en la población de células nucleadas en sangre periférica mediante citometría de flujo. Este análisis mostró un aumento significativo en la proporción celular perteneciente al linaje mieloide GR1+ (fig.45A) sin afectar de forma significativa al linaje linfocitoide B (B220+) o T (CD3+) (fig.45B).



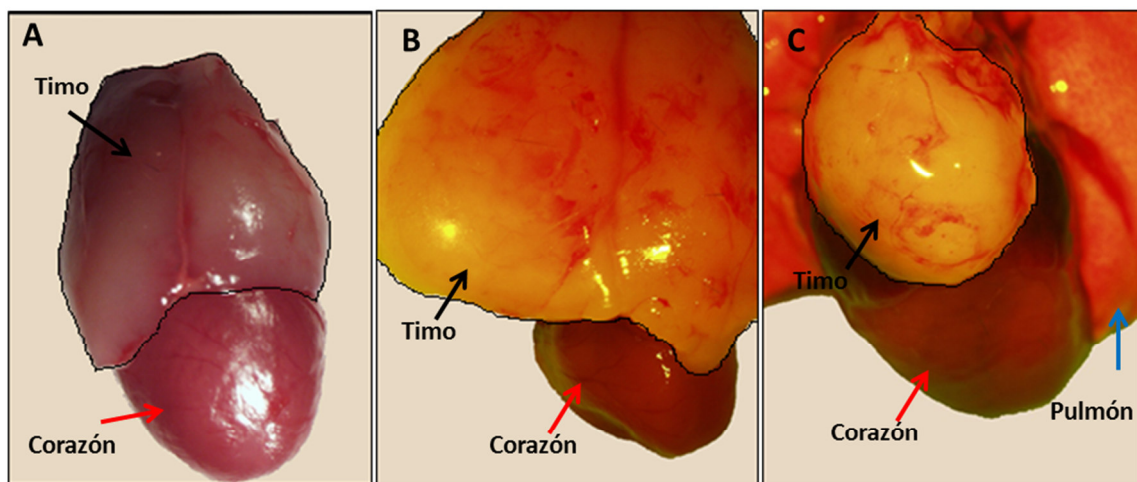
**Figura 45. Análisis por citometría de flujo de sangre periférica.** A) Representación del estudio de linajes hematopoyéticos en animales TKO y animales control. B) Representación de las subpoblaciones de células T de los mismos animales.

Si bien no se observaron diferencias en las distintas poblaciones de células T en sangre periférica (Fig 45B), dado que las células epiteliales del timo modulan la diferenciación de estos linfocitos se estudió la distribución de las diferentes poblaciones de células T en el timo (fig.46). Este análisis reveló que existía una diferencia muy significativa en la frecuencia de la población CD4-CD8- en timo de ratones TKO que indica una hiperproliferación de timocitos inmaduros. Asimismo se encuentra un aumento de la población CD4-CD8+ indicando una tendencia de los timocitos a madurar como linfocitos T CD8+. Dado que en sangre periférica no se observa ese aumento en la población CD8+ (Fig 45B), es posible que estos timocitos no sean funcionales.



**Figura 46.** Análisis por citometría de flujo de las subpoblaciones de linfocitos T en el timo. Representación gráfica del porcentaje de las poblaciones de linfocitos T en timo de animales TKO frente a animales control. (\*\*\*\*  $p < 0,00001$ )

Estas observaciones muestran que la eliminación de los genes de la familia retinoblastoma en las células epiteliales del timo resulta en una expansión de timocitos inmaduros y afecta a la diferenciación de las células T. Además, aunque los análisis de citometría se realizaron en timos con un fenotipo similar al control, una proporción importante (60%;  $n=15$ ) de los animales TKO presentaban una aumento muy considerable del tamaño del timo (fig.47). Esto podría indicar que los análisis realizados correspondían a ratones en estado previo al desarrollo de timomas.

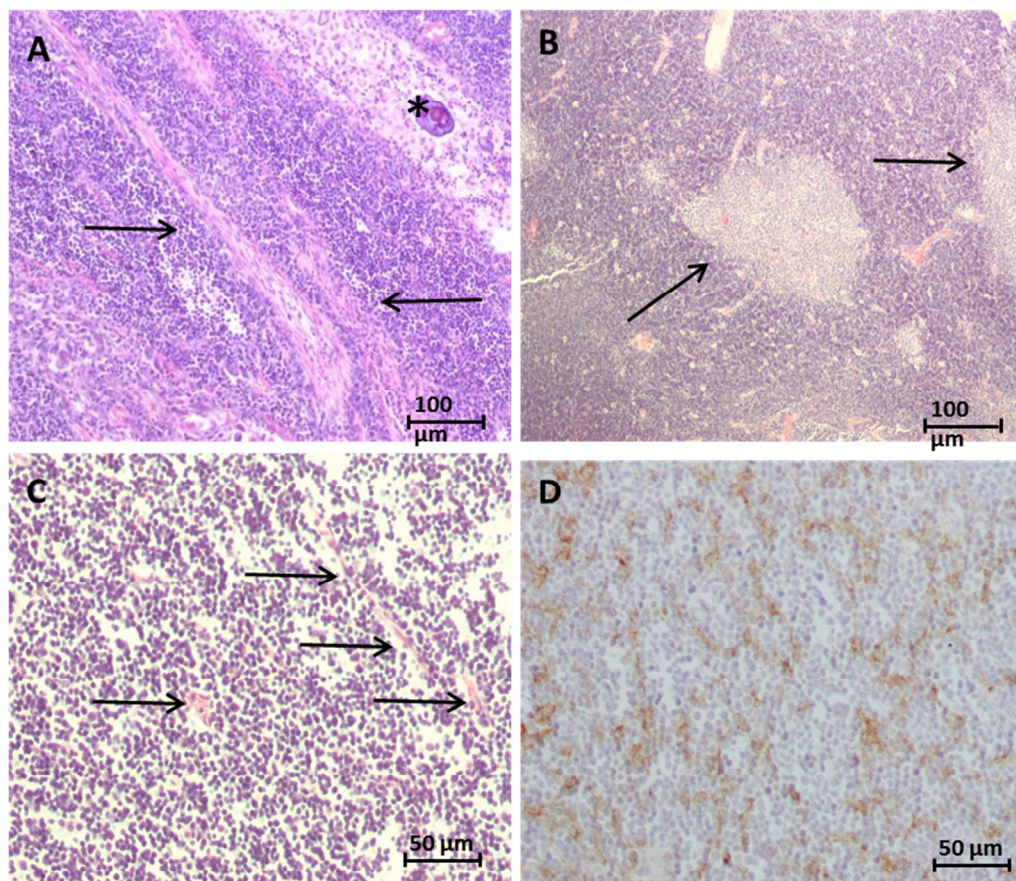


**Figura 47. Timos.** (A) Timo de animal control. (B) y (C) Timos de animales TKO. (animales sacrificados 4 meses y medio después del tratamiento)

En consecuencia se analizó el timo en animales adultos. El estudio histopatológico mostró un elevado número de células linfoides distribuidas difusamente, demarcadas en algunos casos por



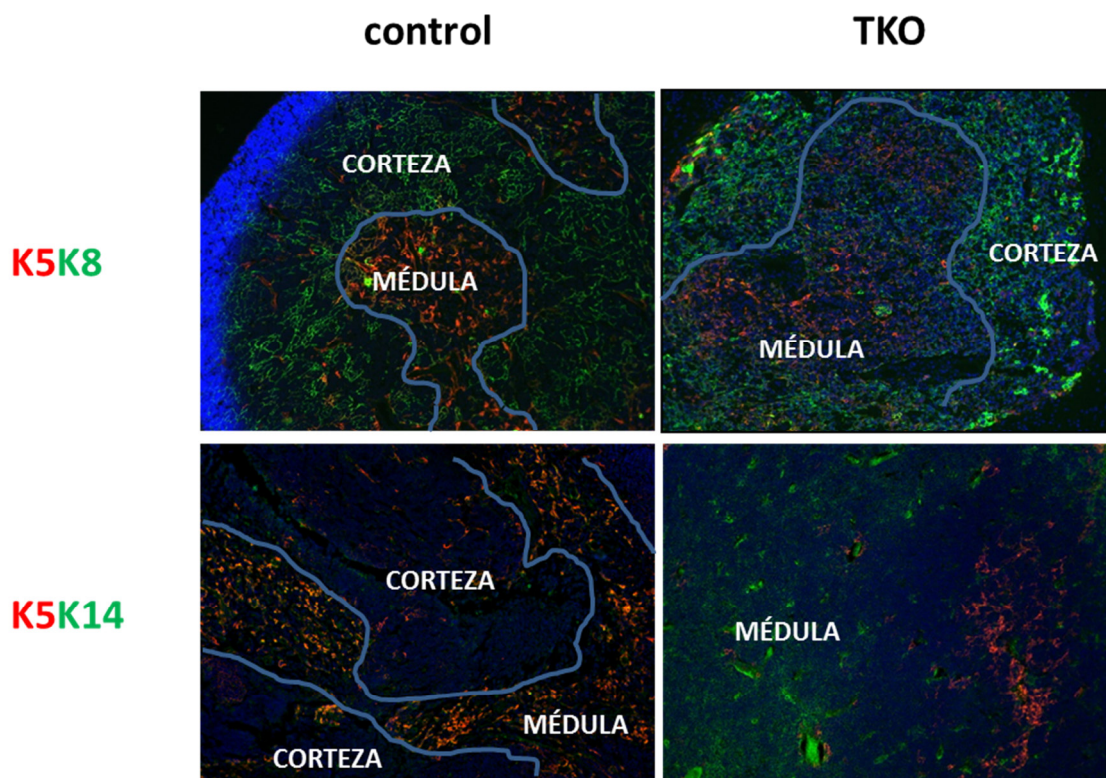
tractos de fibrosis, advirtiéndose focos de diferenciación medular tímica (fig.48B), con escasos linfocitos y células de tipo epitelial. En el resto de las áreas, las células de mayor diámetro que corresponden a células epiteliales tímicas (reticuloepiteliales) (fig.48C) estaban más dispersas. Estas lesiones son compatibles con una patología asimilable a un timoma epitelial rico en linfocitos (predominantemente cortical). De acuerdo con esto, se observaron pequeñas calcificaciones (fig.48A), que son frecuentes en este tipo de tumores. Además el análisis mediante inmunohistoquímica contra queratinas (fig.48D), permitió ver con mayor definición y evidencia las células reticuloepiteliales tímicas, confirmando el diagnóstico.



**Figura 48. Imágenes histológicas de los timomas (H/E) de animales TKO. (A)** Detalle de trabéculas fibrosas que se adentran en el tumor (flechas) y calcificaciones (asterisco). **(B)** Focos de diferenciación medular tímica acompañados de una disminución del número de linfocitos (flechas). **(C)** Detalle de células reticuloepiteliales del timoma entre un elevado número de linfocitos (flechas). **(D)** Inmunomarcación de las células reticuloepiteliales con un anticuerpo anti-citoqueratinas.

La diferenciación de las células epiteliales del timo transcurre a través de diversas fases que se caracterizan por cambios en la expresión de queratinas y de localización de estas células. Así, en la médula las células epiteliales expresan K5 y K14, mientras que en la corteza las células epiteliales se caracterizan por la expresión de K8 y K18. Además se ha caracterizado una posible

población de células progenitoras que expresa K5 y K14. El estudio de estos marcadores en animales TKO mostró la presencia predominante de células positivas para queratina K8 en la corteza tímica, si bien también se observó una importante proporción de células K5-K8+ en la médula tímica. De forma análoga, en animales control la población K5+K14+ está predominantemente en la médula, mientras que en animales TKO se encontró una expresión separada en esta zona del timo, con células K5+K14- y K5-K14+ y una importante reducción de la población K5+K14+ (fig.49).

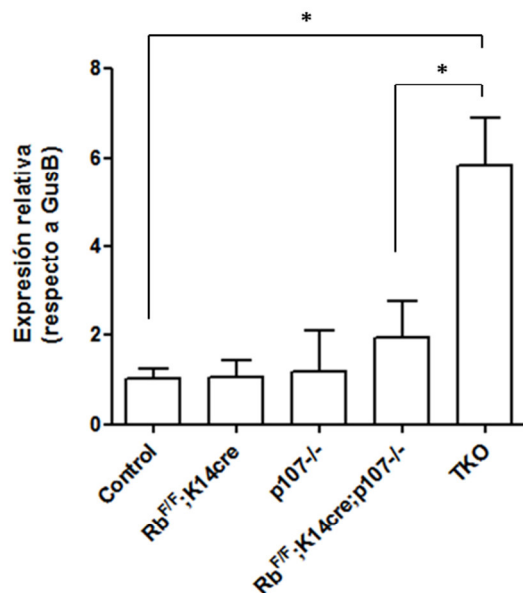


**Figura 49.** Estudio de la diferenciación tímica. Expresión de la queratinas K5, K8 y K14 en timos de ratones TKO y ratones control.

En estudios futuros sería interesante estudiar el estado de la población linfoide en los timomas, previendo una posible expansión de timocitos.

Por otro lado, el trabajo del grupo de Julien Sage ha demostrado que el modelo condicional *Rb1<sup>F/F</sup>;Rbl2<sup>F/F</sup>;Rbl1+/-; Mx1-Cre* conduce a un aumento en la proliferación de la población de células epiteliales en el timo y previene la involución tímica a través de un incremento en los niveles de expresión del factor de transcripción FoxN1 (Garfin et al., 2013). Esta premisa está de acuerdo con nuestros datos que indican un aumento significativo de la expresión de FoxN1 en pieles de animales TKO frente a animales control y modelos múridos deficientes en pRb y p107 (fig.50).

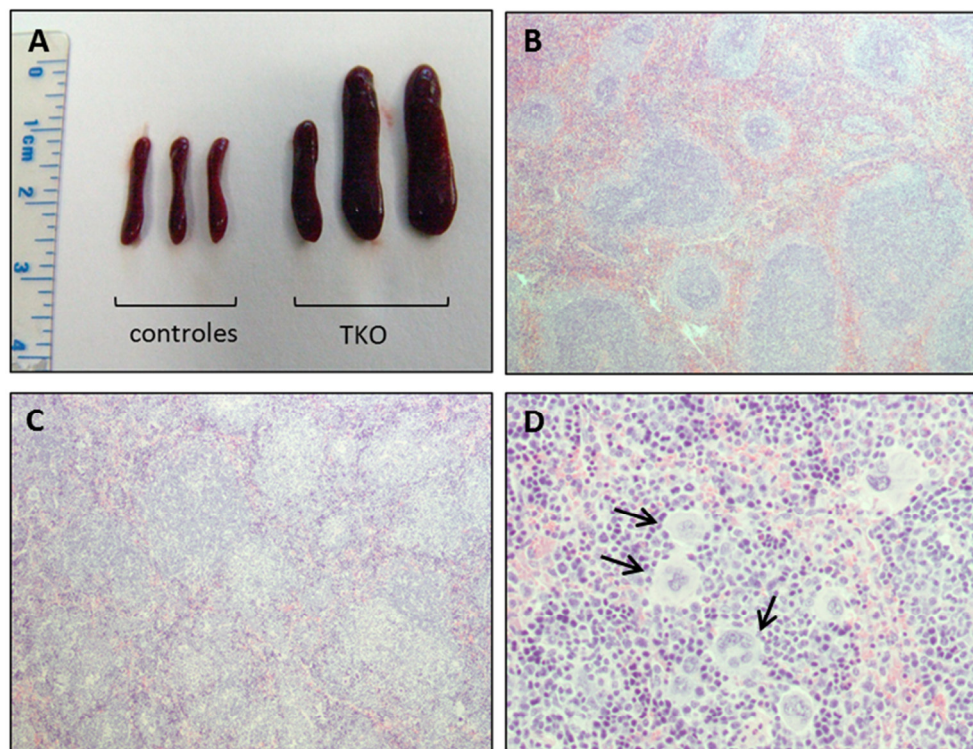




**Figura 50.** Desregulación de la expresión de FoxN1 en pieles de ratones TKO en comparación con modelos deficientes en pRb, p107 y ambos (\*p<0,01)

### 5.5. Efectos en el bazo de la eliminación de los genes de la familia retinoblastoma

Durante la necropsia se apreció, en la totalidad de los animales TKO, el desarrollo de esplenomegalia. En el estudio histológico de los bazos se pudo observar la presencia de hematopoyesis extramedular en distintos grados, desde pequeños focos de proliferación en la pulpa esplénica roja hasta invasión de la pulpa esplénica blanca. En todos estos casos, aunque en distinta medida, se observa un gran número de megacariocitos. Además, algunos animales presentaban hiperplasia linfoide de los folículos de la pulpa esplénica blanca y en otros se observó una proliferación linfoide atípica.



**Figura 51. Comparación de bazo de animales TKO frente a animales control. (A)** Imagen de bazo de animales control y animales TKO tratados con tamoxifeno. **(B)** Histología (H&E) de la estructura cortico-medular de un animal control. **(C)** Histología de la estructura desorganizada del bazo de un animal TKO. **(D)** Histología (H&E) del bazo de una animal TKO con presencia de megacariocitos (indicados con flechas).

La hematopoyesis extramedular es un proceso fisiológico normal en la pulpa esplénica roja de ratón y su aumento puede ser debido a múltiples factores siendo, por tanto, un signo inespecífico. La hiperplasia de los folículos linfoides puede estar asociada a los diversos procesos inflamatorios presentes en este modelo.

Los resultados obtenidos en el estudio de los animales TKO introducen nuevos aspectos sobre las funciones de la familia retinoblastoma y más en concreto del gen *Rb12* en los efectos que difieren del modelo *Rb<sup>Δind</sup>*; *p107<sup>-/-</sup>* (Costa et al., 2012). Un estudio en profundidad de los timos y bazo de estos ratones ampliará el conocimiento del efecto causado por la pérdida de expresión de la familia retinoblastoma.

*Discusión*



# Discusión

---

## Papel de miR21 en metástasis

El supresor tumoral p53 desempeña un papel fundamental en la aparición y desarrollo de diversos cánceres humanos que afectan a más del 50% de los pacientes. Además, las mutaciones de *TP53* se han asociado con mal pronóstico y alto potencial metastásico. Esto hace de la vía de p53 una de las principales y más importantes dianas para el diseño de fármacos quimioterapéuticos.

La metástasis es la principal causa de mortalidad por cáncer en humanos. En los tumores epiteliales la metástasis se asocia con la pérdida de características epiteliales y la adquisición de propiedades mesenquimales por un proceso genéticamente controlado llamado transición epitelio-mesenquima (TEM), que también es esencial durante el desarrollo embrionario (Moreno-Bueno et al., 2008; Peinado et al., 2007). Estos hechos han supuesto enormes esfuerzos para comprender el mecanismo molecular que regula la TEM con el fin de encontrar posibles agentes terapéuticos que alteren el crecimiento metastásico de los tumores.

Trabajos previos en nuestro laboratorio demostraron que los tumores espontáneos de piel causados por la deficiencia epidérmica específica de *Trp53* (o simultánea *Rb1* y *Trp53* (Martinez-Cruz et al., 2008) sufren rápidamente el proceso de TEM y frecuentemente metastatizan a los pulmones. En consecuencia, el desarrollo de ratones deficientes en p53 ha permitido obtener un modelo en el que caracterizar la asociación del proceso de TEM con las propiedades metastásicas.

Los eventos moleculares que rigen este proceso están en general caracterizados por una señalización aberrante que conduce a la expresión de genes reguladores como *Snai1*, *Twist*, *ZEB1*, *ZEB2* y *FoxC2*. Datos previos han apuntado ya a una relación entre la TEM y la inactivación de p53 a través de diversas vías de señalización, incluyendo TGF $\beta$  (Cordenonsi et al., 2003 Piccolo, 2008), que permiten explicar el mal pronóstico que muestran los tumores humanos con alteración en *TP53* (Petitjean et al., 2007; Toledo and Wahl, 2006).

Más recientemente también se ha demostrado que p53 puede interferir con la malignización tumoral y los procesos de TEM a través de la alteración de la expresión de determinados microARNs, en particular, por la inducción de las familias miR34 o miR200 (Chang et al., 2011; Kim et al., 2011a; Kim et al., 2011b). En nuestros experimentos de microarrays observamos que miR34a y b no discriminan entre pieles y tumores, probablemente debido a la expresión reducida

de estos microARNs en las muestras de piel normal, mientras que no existen diferencias significativas en miR34c entre tumores diferenciados e indiferenciados, lo que está de acuerdo con que p53 se encuentra inactivada en ambos casos. De forma análoga, en el análisis masivo, ninguno de los miembros de la familia miR200 discriminaron entre carcinomas de células escamosas y carcinomas de células fusiformes. Los análisis mediante qPCR mostraron que esta observación puede deberse a la gran variabilidad de expresión de estos microARNs en las diferentes muestras, lo cual conduce a la baja relevancia estadística de las diferencias globales. No obstante, cuando se considera de forma individual la expresión de la familia miR200 se observa reducida en las muestras de tumores metastásicos, de acuerdo con su papel supresor del proceso de TEM.

El estudio integral de la expresión de miARNs mostró, en los tumores de los animales p53<sup>ΔCE</sup>, una desregulación importante de varios microARNs implicados en el desarrollo epidérmico (Andl et al., 2006; Yi et al., 2006) y metástasis (Dykxhoorn, 2010; Zhang et al., 2010). Además, algunos de estos microARNs se expresaban preferentemente en tumores con morfología fusiforme. En particular, se observó una buena correlación con el aumento de expresión de miR21 en carcinomas de células fusiformes, y la clasificación no supervisada de las muestras en función de la expresión de genes regulados por miR21 discrimina entre tumores metastásicos y no metastásicos. Estos datos indican un papel preponderante de este microARN en el proceso de malignización de los tumores de nuestro modelo. Asimismo, se ha observado el aumento de la expresión de miR21 en tumores humanos con mutaciones en *TP53* y desarrollo de metástasis (Selcuklu et al., 2009). Este último aspecto podría justificar el peor pronóstico en los pacientes de cáncer de pulmón analizados en este trabajo cuando expresan altos niveles de miR21.

En general, las funciones de miR21 en oncogénesis y metástasis se han asociado con su capacidad de inhibir múltiples supresores de tumores, como PTEN y Spry1/2, llevando a aumentar la actividad de Akt y MAPK (Ma et al., 2011; Meng et al., 2007; Pezzolesi et al., 2008). Nuestros datos corroboran esta actividad mostrando un aumento de las actividades de Akt y MAPK en paralelo con el aumento de expresión de miR21 (fig.6). Además pudimos relacionar dicho aumento de actividad con los procesos de la TEM (fig.6). Sin embargo, el aumento de la expresión de miR21 fue incapaz de promover la TEM en queratinocitos inmortalizados no transformados (fig.7C). Por el contrario, en las células transformadas PB la expresión aumentada de miR21 sí fue capaz de contribuir al desarrollo de tumores poco diferenciados y a la adquisición de propiedades metastásicas (fig.11). Esta observación está de acuerdo con datos anteriores de nuestro grupo que mostraban que el aumento de la actividad de Akt confiere agresividad, capacidad metastásica y desarrollo de angiogénesis en los tumores generados por células PB en ratones inmunodeficientes (Segrelles et al., 2002; Segrelles et al., 2004). Sin embargo, la disminución de

miR21 en células 940T derivadas de un tumor primario metastásico es insuficiente para revertir el proceso de TEM, lo que sugiere que otros factores, además de la inducción de miR21, son necesarios para inducir TEM. Con todo, la inhibición de miR21, mediante miRZIP, condujo en células 940T a la reducción de su capacidad migratoria y metastásica (fig.14).

Si bien miR21 se encuentra aumentado en tumores humanos con mutación en p53 (Selcuklu et al., 2009), no se ha reportado una modulación transcripcional directa. Asimismo, nuestros datos sugieren que otros factores, además de la pérdida de p53, contribuyen al aumento de miR21, ya que éste se observa muy aumentado en tumores fusiformes con respecto a los tumores escamosos, siendo ambos deficientes en p53. Entre los mecanismos propuestos para la inducción de miR21 destaca la señalización mediada por TGF $\beta$ . Este factor se ha observado que conduce a la disregulación de microARNs (Davis et al., 2008; Suzuki and Kiyazono, 2010) que incluye a diversos miembros implicados en oncogénesis y en desarrollo de metástasis (Cano and Nieto, 2008; Dykxhoorn, 2010; Zhang et al., 2010). Por otro lado, la capacidad de TGF $\beta$  de inducir el proceso TEM ha sido ampliamente reportada, asociándose a la inducción de diversos genes, incluido el factor de transcripción Snail (Peinado et al., 2003). Nuestros datos indican que la sobreexpresión de Snail es capaz de inducir miR21 y que, tanto la expresión forzada de Snail como miR21, contribuyen a incrementar la migración e invasividad de las células transformadas PB (fig.10).

Entre los posibles mecanismos que conducen a la inducción de miR21 se ha demostrado la implicación de la activación de Stat3 (Loffler et al., 2007) y las vías de señalización PI3K/Erk (Frezzetti et al., 2011). Considerando que las vías Stat3 y mTOR se activan por la pérdida de p53 (Feng et al., 2007; Feng and Levine, 2010 #220; Feng et al., 2005; Lin et al., 2002a; Lin et al., 2002b) y se encuentran funcionalmente interconectadas (Ma et al., 2010; Onda et al., 2002), ambas vías podrían contribuir en nuestro modelo al aumento de la expresión de miR21. Nuestros datos muestran una mayor actividad de mTOR y/o Stat3 en tumores indiferenciados en paralelo con un aumento de los niveles de miR21 (fig.17). La aproximación farmacológica, empleando inhibidores específicos contra estas vías, indicó que la inducción de miR21 podría ser atribuido, en este sistema, a una acción coordinada de ambas (fig.18). Dada la relación entre miR21 y desarrollo metastásico, esta observación abre la posibilidad de considerar que inhibidores de aplicación clínica de estas vías podrían ser de particular relevancia para prevenir la diseminación metastásica en pacientes con tumores que presenten alteraciones de p53.

## Papel de p63 en metástasis

La familia de p53 incluye, además de p53, a las proteínas p73 y p63. Éstas presentan, mediante el empleo de promotores alternativos y procesamiento diferencial, una gran variedad de isoformas con implicación diferencial y múltiple en tumorigénesis, y en algunos casos, mediante la interacción funcional con p53. En particular la isoforma  $\Delta$ Np63, característica de células con capacidad proliferativa de epitelios estratificados, presenta una clara sobreexpresión en carcinomas de células escamosas de piel, cabeza y cuello y pulmón de pacientes humanos (Hibi et al., 2000; Tonon et al., 2005). Además se ha observado que dicha sobreexpresión es capaz de inhibir el proceso de senescencia prematura inducida por oncogenes (Keyes et al., 2011). Estas observaciones han conducido a considerar a  $\Delta$ Np63 como un potencial oncogén. No obstante, en algunos casos se ha caracterizado una reducción o pérdida de expresión de p63 en tumores metastásicos o en el frente invasivo tumoral, lo que sugiere que p63 podría presentar un papel dual, actuando como oncogén en etapas tempranas y como un potencial supresor de la metástasis en etapas posteriores (Koga et al., 2003; Piccolo et al., 2013; Tucci et al., 2012). Nuestro trabajo proporciona una prueba de esta función dual en el contexto de deficiencia de p53 (tumores espontáneos en ratones *Trp53*<sup>ΔCE</sup> y células 940T).

Hemos observado que la disminución de la expresión de  $\Delta$ Np63 es un evento temprano durante el desarrollo de tumores espontáneos atribuibles a la deficiencia de p53 en epidermis, si bien la expresión de  $\Delta$ Np63 se recupera en las lesiones metastásicas de pulmón (fig.20), indicando que la disminución de  $\Delta$ Np63 observada en los tumores primarios no es atribuible a la delección del gen, sino más bien a su silenciamiento. Los ensayos encaminados a la reactivación de la expresión de  $\Delta$ Np63 mediante el empleo de inhibidores farmacológicos (fig.22), aunque no han permitido restaurar los niveles observados en células control, indican que el silenciamiento observado podría atribuirse a la acción concertada de varias vías de señalización como mTOR y TGF $\beta$ .

Entre los diversos estudios que han indicado el posible papel de p63 como supresor del proceso de TEM, cabe señalar aquellos que muestran que  $\Delta$ Np63 $\alpha$  se reprime por TGF $\beta$  proporcionando a los queratinocitos propiedades de células madre (Oh et al., 2011). Nuestros datos podrían ser concordantes con esta premisa, ya que hemos observado un aumento de la activación de Smad2/3 en paralelo con la inducción de Snail y represión de E-cadherina y p63 en los tumores primarios (fig.21), y el empleo del inhibidor *SB431542*, que actúa sobre los receptores de TGF $\beta$ , permite un ligero aumento de la expresión de  $\Delta$ Np63 $\alpha$  (fig.22).



Para comprobar el posible papel de p63 en TEM, se ha procedido a la expresión forzada de hu $\Delta$ Np63 $\alpha$  en las células 940T. Si bien no se observan cambios significativos en la morfología celular, si hemos comprobado la disminución de diversos factores de transcripción que median el proceso de TEM (Snail, Twist, ZEB1, ZEB2 y FoxC2), así como un moderado aumento de E-cadherina (fig.28). De forma relevante, los datos de inmunoprecipitación de cromatina y secuenciación masiva, que han identificado la unión de p63 a más de 7.000 genes en una zona de hasta 25 Kb del sitio de inicio de la transcripción (Kouwenhoven et al., 2010; McDade et al., 2012; Olsen et al., 2013), muestran que ninguno de estos factores de transcripción presenta sitios de unión específicos de p53, indicando que la regulación observada debe ser indirecta. En este sentido, como se ha comentado en el apartado anterior, los microARNs juegan un papel clave en el proceso de TEM en parte a través de modular la expresión de estos factores de transcripción (Huangyang and Shang, 2013; Wu et al., 2012). Además, cabe destacar que varios de estos microARNs han sido identificados por presentar sitios de unión a p53 (miR21, miR34a), p63 (miR200a, miR200b) o ambos (miR205) (McDade et al., 2012; Olsen et al., 2013). Nuestros datos, comparando las células 940T y aquellas con expresión forzada de hu $\Delta$ Np63 $\alpha$ , apoyarían la hipótesis de que p63 actúa modulando la expresión de varios de estos microARNs (miR21, miR34a, miR200a, miR200b, miR203, miR205 y miR19a), lo que conduciría a la represión de los factores de transcripción que modulan el proceso de TEM. Estudios futuros mediante aproximaciones de análisis genómico nos permitirán determinar qué otros elementos clave del proceso se ven afectados directa o indirectamente por la expresión de  $\Delta$ Np63 $\alpha$ .

Como se ha comentado, el proceso de TEM es clave en la diseminación metastásica de los tumores. En consecuencia, los datos observados tras la expresión forzada de hu $\Delta$ Np63 $\alpha$  indicarían alteraciones en el desarrollo de metástasis como consecuencia de alteraciones en los niveles de  $\Delta$ Np63. Las observaciones tras la inyección subcutánea (fig.31) o intravenosa (fig.32) de las células con expresión forzada de hu $\Delta$ Np63 $\alpha$  podrían reforzar esta hipótesis. Sin embargo, el silenciamiento observado en la proteína transfectada (fig.33) impide una confirmación total. Experimentos futuros diseñados para el silenciamiento de la proteína  $\Delta$ Np63 endógena en células tumorales poco metastásicas (p.ej. células PB) nos permitirán en el futuro confirmar de forma fehaciente esta posibilidad.

En conjunto, nuestros datos refuerzan el posible papel de p63 como supresor de la metástasis en un contexto de deficiencia de p53, a través de la regulación de diversos microARNs y factores de transcripción que modulan los procesos de TEM.

# Caracterización del modelo TKO

Los miembros de la familia de retinoblastoma han sido descritos como moduladores esenciales en la progresión del ciclo celular (Weinberg, 1995). Además, se ha reportado su implicación en el control de la diferenciación celular durante la embriogénesis y en los tejidos adultos, la regulación de la apoptosis y la preservación de la estabilidad cromosómica (Zheng and Lee, 2001; Dannenberg and Riehl, 2006).

El uso de modelos animales convencionales deficientes en uno o dos miembros de la familia retinoblastoma impide analizar la funcionalidad de estas proteínas en tejidos adultos debido a la mortalidad perinatal de los animales. Esto se solventa con el desarrollo de modelos animales condicionales deficientes en diferentes combinaciones de la familia retinoblastoma en un tejido específico de un modo agudo o crónico.

En animales *knock-out* convencionales, la eliminación de *Rb1* produce letalidad embrionaria (Lee et al., 1992). La eliminación de p107 o p130 no muestra fenotipo en los ratones y no se observa predisposición al desarrollo tumoral (Lee et al., 1996; Cobrinik et al., 1996). Sin embargo, la eliminación simultánea de ambos muestra letalidad neonatal y problemas de desarrollo (Cobrinik et al., 1996). Esto indica la existencia de funciones compartidas entre p107 y p130 que pRb no tiene capacidad de compensar.

También se ha reportado la existencia de funciones superpuestas entre p107 y pRb en tejidos adultos (Lee et al., 1996). Por lo tanto, p107 desempeña la función de supresor tumoral en ausencia de pRb (Robanus-Maandag et al., 1998), aunque también se ha descrito esta función para p130 (Dannenberg et al., 2004).

Estudios previos en nuestro laboratorio con modelos condicionales mostraron que la pérdida aguda (tejidos adultos) de pRb en epitelios estratificados (Costa et al., 2012; Costa et al., 2013a) lleva a alteraciones en la diferenciación y proliferación epidérmica aunque no al desarrollo de tumores. Sin embargo, la ausencia de p107 y pRb conduce al desarrollo de tumores espontáneos (Costa et al., 2012), confirmando el papel de p107 como supresor tumoral en epidermis en ausencia de pRb.

Por otro lado, la deficiencia en p130 no agrava el fenotipo en piel producido por la ausencia de pRb sugiriendo una ausencia de compensación funcional entre ambas proteínas (Lara, 2008a). Sin embargo, se observaron cambios genómicos con respecto a animales deficientes en pRb (Lara, 2008a).

En el presente trabajo caracterizamos un nuevo modelo donde se eliminan los tres miembros de la familia retinoblastoma, *Rb1*, *Rbl1* y *Rbl2* en epitelios estratificados.

Estos animales muestran una mortalidad precoz que obligó a reducir la dosis inicial de tamoxifeno tomada de trabajos previos (Costa et al., 2012; Costa et al., 2013b) para aumentar su viabilidad. Esta letalidad temprana ha sido descrita en otros modelos deficientes en la familia retinoblastoma (Viatour et al., 2008), lo que indica que la familia retinoblastoma es esencial para la supervivencia de los animales de manera independiente de tejido.

Los animales TKO presentan un fenotipo extremo en la piel marcado por una fuerte hiperplasia e hiperqueratosis con desarrollo de tumores espontáneos. Modelos anteriores deficientes en miembros de la familia retinoblastoma han relacionado el desarrollo tumoral con la pérdida parcial de activación de p53. Por otro lado, el modelo TKO se ha utilizado recientemente para estudiar los mecanismos moleculares que llevan al desarrollo de tumores en vejiga (Santos et al., 2014), donde se observó una penetrancia tumoral del 100% y un incremento de expresión de p53. Sin embargo, estos tumores fueron superficiales, por lo que se podría pensar que p53 está ejerciendo su función de supresor tumoral impidiendo la malignización de los tumores. Los tumores de piel de los animales TKO, a diferencia de los de vejiga, si malignizan, por lo que se podría pensar que en la piel si hay una pérdida de la actividad de p53. Además, se sabe que la ausencia simultánea de pRb y p107 en piel está asociada a una pérdida parcial de la activación de p53 (Costa et al., 2012) y que p130 actúa como supresor tumoral en un modelo deficiente en pRb y p53 en cáncer de pulmón de células pequeñas (Schaffer et al., 2010). Estos resultados podrían deberse a una diferencia en la activación de p53 dependiendo de qué miembros de la familia retinoblastoma estén ausentes y la combinación de estos, o podrían sugerir que su actividad es dependiente de tejido en ausencia de pRb, p107 y/o p130. Sería de gran interés hacer un estudio en profundidad de la expresión de p53 para dilucidar su estado de activación en diferentes tejidos que hayan sufrido una pérdida parcial o total de los miembros de la familia retinoblastoma.

También se ha observado desarrollo tumoral en modelos deficientes en otros genes relacionados con la familia retinoblastoma, como p21 (Brugarolas et al., 1998), cuya expresión está íntimamente controlada por p53. Así, el modelo  $pRb^{Epi};p21^{-/-}$  desarrolla procesos inflamatorios en la piel seguidos del desarrollo de tumores espontáneos (Saiz-Ladera et al., 2014). Este efecto también se observa en la piel de los animales TKO, lo cual podría sugerir una disminución en la expresión de p21 en este modelo.

Con todo ello, conocidas las alteraciones en la expresión génica de modelos anteriores deficientes en uno o dos miembros de la familia retinoblastoma, sería importante conocer los cambios en la expresión génica producidos por la pérdida de los genes *Rb1*, *Rbl1* y *Rbl2* en epitelios estratificados y conocer en profundidad el estado de activación de p53 en los ratones TKO así como las vías de señalización implicadas en el desarrollo tumoral.

Por otra parte, se han observado diversos efectos no descritos en los modelos anteriores y que añaden relevancia a la función de p130 en un contexto de deficiencia en pRb y p107 en piel.

Los animales TKO presentan esplenomegalia, con una incidencia del 100%. Este efecto se ha descrito en animales *Mx1-Cre Rb<sup>lox/lox</sup>;p130<sup>lox/lox</sup>;p107<sup>+/-</sup>* que presentan una letalidad temprana como resultado de hiperproliferación en múltiples órganos, como el bazo (Viatour et al. 2008). La supervivencia de estos animales aumenta al introducir un alelo p107 (Garfin et al., 2013) pero siguen desarrollando esplenomegalia.

Por otro lado, todo parece indicar que el efecto sistémico del tamoxifeno afecta a células epiteliales con expresión de la queratina K14 en órganos internos. El desarrollo de tumores de origen epitelial en el timo, que posee células que expresan la queratina K14, indica que la ausencia de la familia retinoblastoma propicia el desarrollo tumoral en este órgano. Esto se correlaciona con lo observado previamente en otros modelos. Los ratones *Mx1-Cre Rb<sup>lox/lox</sup>;p130<sup>lox/lox</sup>;p107<sup>+/-</sup>* presentan un timo de gran tamaño y un aumento en la proliferación de la población de células epiteliales (Garfin et al., 2013). En nuestro modelo hemos observado, en un alto porcentaje de los animales, el desarrollo de timomas. Un estudio comparativo de la recombinación de *Rb1* y *Rb2* en el timo podría esclarecer como la pérdida de los distintos miembros de la familia retinoblastoma produce este efecto en dicho órgano.

En conjunto, los efectos observados en timo y bazo indican que la eliminación de toda la familia retinoblastoma está relacionada con una alteración del sistema linfóide. Además, el modelo K5-D1, en el que la ciclina D1 se expresa en tejidos epiteliales bajo el promotor de la queratina K5, desarrollado en nuestro departamento (Robles et al., 1996) mostraba una hiperplasia severa en el timo que causaba la muerte prematura de los animales debido a una oclusión de las vías respiratorias superiores. La ciclina D1 forma complejos con CDK4/6 fosforilando a los miembros de la familia retinoblastoma y promoviendo la progresión del ciclo celular.

Ambos modelos refuerzan que la inactivación funcional de la familia retinoblastoma puede conducir al desarrollo de timomas.

Por ello, podría ser interesante un estudio en profundidad del timo de los distintos modelos deficientes en uno o varios miembros de la familia retinoblastoma en epitelios estratificados, para intentar establecer si el timo se ve afectado por la eliminación simultánea de todos los miembros de la familia retinoblastoma o si cada uno de ellos de forma individual o combinados ejercen alguna alteración funcional en este órgano.

Todos estos hallazgos introducen novedosos aspectos sobre las funciones de la familia retinoblastoma y más en concreto del gen *Rb2*. A pesar de ello, será necesario un estudio en

mayor profundidad de estos ratones para ahondar en el conocimiento de las consecuencias de la pérdida de expresión de la familia retinoblastoma.



*Conclusiones*





# Conclusiones

---

1. La capacidad metastásica de los tumores espontáneos, producidos como consecuencia de la eliminación de p53 en epidermis (*Trp53<sup>ΔEC</sup>* y *Rb<sup>ΔEC</sup>;Trp53<sup>ΔEC</sup>*), está asociada a una fuerte desregulación de diversos microARNs.
2. El aumento de expresión de miR21, si bien no es un evento suficiente para la transformación neoplásica, es necesario para el desarrollo de metástasis a partir de tumores epidérmicos deficientes en p53.
3. El aumento de expresión de mir21 en tumores metastásicos *Trp53<sup>ΔEC</sup>* y *Rb<sup>ΔEC</sup>;Trp53<sup>ΔEC</sup>* se correlaciona con una mayor actividad de mTOR y/o Stat3 y puede ser revertido farmacológicamente.
4. El aumento de expresión de miR21 se correlaciona con una peor evolución clínica en pacientes humanos de cáncer de pulmón.
5. La disminución de la expresión de ΔNp63α es un evento temprano en los tumores espontáneos producidos como consecuencia de la eliminación de p53 en epidermis (*Trp53<sup>ΔEC</sup>* y *Rb<sup>ΔEC</sup>;Trp53<sup>ΔEC</sup>*), aunque no se asocia con el estado de diferenciación de los mismos.
6. La expresión de ΔNp63α reprime parcialmente el proceso de TEM y el desarrollo metastásico, probablemente a través de la regulación de diversos microARNs que, a su vez, modulan la expresión de diversos factores de transcripción implicados en estos procesos.
7. La eliminación de la familia retinoblastoma en epitelios estratificados de ratones adultos conduce a una letalidad temprana por causas aún no determinadas.
8. La pérdida de la familia retinoblastoma en epitelios estratificados produce alteraciones en los procesos de diferenciación y proliferación, y conduce al desarrollo de tumores espontáneos.
9. La eliminación de los genes de la familia retinoblastoma en epitelio estratificado tiene un efecto en el timo que resulta en una expansión de timocitos inmaduros y afecta a la diferenciación de las células T, conduciendo al desarrollo de timomas.
10. Los resultados preliminares obtenidos en el estudio de los animales TKO sugieren funciones de la familia retinoblastoma en tejidos no analizados previamente como timo y bazo.



## *Bibliografía*



# Bibliografía

---

- Adorno, M., M. Cordenonsi, M. Montagner, S. Dupont, C. Wong, B. Hann, A. Solari, S. Bobisse, M. B. Rondina, V. Guzzardo, A. R. Parenti, A. Rosato, S. Bicciato, A. Balmain, and S. Piccolo, 2009, A Mutant-p53/Smad complex opposes p63 to empower TGFbeta-induced metastasis: *Cell*, v. 137, p. 87-98.
- Andl, T., E. P. Murchison, F. Liu, Y. Zhang, M. Yunta-Gonzalez, J. W. Tobias, C. D. Andl, J. T. Seykora, G. J. Hannon, and S. E. Millar, 2006, The miRNA-processing enzyme dicer is essential for the morphogenesis and maintenance of hair follicles: *Curr Biol*, v. 16, p. 1041-9.
- Ansieau, S., J. Bastid, A. Doreau, A. P. Morel, B. P. Bouchet, C. Thomas, F. Fauvet, I. Puisieux, C. Doglioni, S. Piccinin, R. Maestro, T. Voeltzel, A. Selmi, S. Valsesia-Wittmann, C. Caron de Fromentel, and A. Puisieux, 2008, Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence: *Cancer Cell*, v. 14, p. 79-89.
- Aomatsu, K., T. Arao, K. Sugioka, K. Matsumoto, D. Tamura, K. Kudo, H. Kaneda, K. Tanaka, Y. Fujita, Y. Shimomura, and K. Nishio, 2011, TGF-beta induces sustained upregulation of SNAI1 and SNAI2 through Smad and non-Smad pathways in a human corneal epithelial cell line: *Invest Ophthalmol Vis Sci*, v. 52, p. 2437-43.
- Attardi, L. D., and L. A. Donehower, 2005, Probing p53 biological functions through the use of genetically engineered mouse models: *Mutat Res*, v. 576, p. 4-21.
- Balciunaite, E., A. Spektor, N. H. Lents, H. Cam, H. Te Riele, A. Scime, M. A. Rudnicki, R. Young, and B. D. Dynlacht, 2005, Pocket protein complexes are recruited to distinct targets in quiescent and proliferating cells: *Mol Cell Biol*, v. 25, p. 8166-78.
- Barbieri, C. E., L. J. Tang, K. A. Brown, and J. A. Pietersen, 2006, Loss of p63 leads to increased cell migration and up-regulation of genes involved in invasion and metastasis: *Cancer Res*, v. 66, p. 7589-97.
- Boominathan, L., 2010, The guardians of the genome (p53, TA-p73, and TA-p63) are regulators of tumor suppressor miRNAs network: *Cancer Metastasis Rev*, v. 29, p. 613-39.
- Botchkareva, N. V., 2012, MicroRNA/mRNA regulatory networks in the control of skin development and regeneration: *Cell Cycle*, v. 11, p. 468-74.
- Boukamp, P., S. Popp, S. Altmeyer, A. Hulsen, C. Fasching, T. Cremer, and N. E. Fusenig, 1997, Sustained nontumorigenic phenotype correlates with a largely stable chromosome content during long-term culture of the human keratinocyte line HaCaT: *Genes Chromosomes Cancer*, v. 19, p. 201-14.
- Brabletz, T., 2012, MiR-34 and SNAIL: another double-negative feedback loop controlling cellular plasticity/EMT governed by p53: *Cell Cycle*, v. 11, p. 215-6.
- Brugarolas, J., R. T. Bronson, and T. Jacks, 1998, p21 is a critical CDK2 regulator essential for proliferation control in Rb-deficient cells: *J Cell Biol*, v. 141, p. 503-14.
- Byrne, C., M. Tainsky, and E. Fuchs, 1994, Programming gene expression in developing epidermis: *Development*, v. 120, p. 2369-83.

- Candi, E., I. Amelio, M. Agostini, and G. Melino, 2015, MicroRNAs and p63 in epithelial stemness: *Cell Death Differ*, v. 22, p. 12-21.
- Cano, A., and M. A. Nieto, 2008, Non-coding RNAs take centre stage in epithelial-to-mesenchymal transition: *Trends Cell Biol*, v. 18, p. 357-9.
- Cano, C. E., Y. Motoo, and J. L. Iovanna, 2010, Epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic adenocarcinoma: *ScientificWorldJournal*, v. 10, p. 1947-57.
- Caputi, M., A. M. Groeger, V. Esposito, A. De Luca, V. Masciullo, A. Mancini, F. Baldi, E. Wolner, and A. Giordano, 2002, Loss of pRb2/p130 expression is associated with unfavorable clinical outcome in lung cancer: *Clin Cancer Res*, v. 8, p. 3850-6.
- Caulin, C., T. Nguyen, G. A. Lang, T. M. Goepfert, B. R. Brinkley, W. W. Cai, G. Lozano, and D. R. Roop, 2007, An inducible mouse model for skin cancer reveals distinct roles for gain- and loss-of-function p53 mutations: *J Clin Invest*, v. 117, p. 1893-901.
- Chang, C. J., C. H. Chao, W. Xia, J. Y. Yang, Y. Xiong, C. W. Li, W. H. Yu, S. K. Rehman, J. L. Hsu, H. H. Lee, M. Liu, C. T. Chen, D. Yu, and M. C. Hung, 2011, p53 regulates epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties through modulating miRNAs: *Nat Cell Biol*, v. 13, p. 317-23.
- Chen, H. Z., S. Y. Tsai, and G. Leone, 2009, Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control: *Nat Rev Cancer*, v. 9, p. 785-97.
- Chipuk, J. E., T. Kuwana, L. Bouchier-Hayes, N. M. Droin, D. D. Newmeyer, M. Schuler, and D. R. Green, 2004, Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis: *Science*, v. 303, p. 1010-4.
- Cho, H. J., K. E. Baek, S. Saika, M. J. Jeong, and J. Yoo, 2007, Snail is required for transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition by activating PI3 kinase/Akt signal pathway: *Biochem Biophys Res Commun*, v. 353, p. 337-43.
- Cinti, C., L. Leoncini, A. Nyongo, F. Ferrari, S. Lazzi, C. Bellan, R. Vatti, A. Zamparelli, G. Cevenini, G. M. Tosi, P. P. Claudio, N. M. Maraldi, P. Tosi, and A. Giordano, 2000, Genetic alterations of the retinoblastoma-related gene RB2/p130 identify different pathogenetic mechanisms in and among Burkitt's lymphoma subtypes: *Am J Pathol*, v. 156, p. 751-60.
- Citterio, C., M. Menacho-Marquez, R. Garcia-Escudero, R. M. Larive, O. Barreiro, F. Sanchez-Madrid, J. M. Paramio, and X. R. Bustelo, 2012, The rho exchange factors vav2 and vav3 control a lung metastasis-specific transcriptional program in breast cancer cells: *Sci Signal*, v. 5, p. ra71.
- Classon, M., and N. Dyson, 2001, p107 and p130: versatile proteins with interesting pockets: *Exp Cell Res*, v. 264, p. 135-47.
- Claudio, P. P., C. M. Howard, C. Pacilio, C. Cinti, G. Romano, C. Minimo, N. M. Maraldi, J. D. Minna, L. Gelbert, L. Leoncini, G. M. Tosi, P. Hicheli, M. Caputi, G. G. Giordano, and A. Giordano, 2000, Mutations in the retinoblastoma-related gene RB2/p130 in lung tumors and suppression of tumor growth in vivo by retrovirus-mediated gene transfer: *Cancer Res*, v. 60, p. 372-82.
- Claudio, P. P., T. Tonini, and A. Giordano, 2002, The retinoblastoma family: twins or distant cousins?: *Genome Biol*, v. 3, p. reviews3012.

- Cobrinik, D., M. H. Lee, G. Hannon, G. Mulligan, R. T. Bronson, N. Dyson, E. Harlow, D. Beach, R. A. Weinberg, and T. Jacks, 1996, Shared role of the pRB-related p130 and p107 proteins in limb development: *Genes Dev*, v. 10, p. 1633-44.
- Cordenonsi, M., S. Dupont, S. Maretto, A. Insinga, C. Imbriano, and S. Piccolo, 2003, Links between tumor suppressors: p53 is required for TGF-beta gene responses by cooperating with Smads: *Cell*, v. 113, p. 301-14.
- Costa, C., J. M. Paramio, and M. Santos, 2013a, Skin Tumors Rb(eing) Uncovered: *Front Oncol*, v. 3, p. 307.
- Costa, C., M. Santos, M. Martinez-Fernandez, M. Duenas, C. Lorz, R. Garcia-Escudero, and J. M. Paramio, 2013b, E2F1 loss induces spontaneous tumour development in Rb-deficient epidermis: *Oncogene*, v. 32, p. 2937-51.
- Costa, C., M. Santos, C. Segrelles, M. Duenas, M. F. Lara, X. Agirre, F. Prosper, R. Garcia-Escudero, and J. M. Paramio, 2012, A novel tumor suppressor network in squamous malignancies: *Sci Rep*, v. 2, p. 828.
- Crum, C. P., and F. D. McKeon, 2010, p63 in epithelial survival, germ cell surveillance, and neoplasia: *Annu Rev Pathol*, v. 5, p. 349-71.
- Dannenberg, J. H., L. Schuijff, M. Dekker, M. van der Valk, and H. te Riele, 2004, Tissue-specific tumor suppressor activity of retinoblastoma gene homologs p107 and p130: *Genes Dev*, v. 18, p. 2952-62.
- Dannenberg, J. H., and H. P. te Riele, 2006, The retinoblastoma gene family in cell cycle regulation and suppression of tumorigenesis: *Results Probl Cell Differ*, v. 42, p. 183-225.
- Dannenberg, J. H., A. van Rossum, L. Schuijff, and H. te Riele, 2000, Ablation of the retinoblastoma gene family deregulates G(1) control causing immortalization and increased cell turnover under growth-restricting conditions: *Genes Dev*, v. 14, p. 3051-64.
- Darido, C., S. R. Georgy, T. Wilanowski, S. Dworkin, A. Auden, Q. Zhao, G. Rank, S. Srivastava, M. J. Finlay, A. T. Papenfuss, P. P. Pandolfi, R. B. Pearson, and S. M. Jane, 2011, Targeting of the tumor suppressor GRHL3 by a miR-21-dependent proto-oncogenic network results in PTEN loss and tumorigenesis: *Cancer Cell*, v. 20, p. 635-48.
- Davis, B. N., A. C. Hilyard, G. Lagna, and A. Hata, 2008, SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation: *Nature*, v. 454, p. 56-61.
- Derynck, R., R. J. Akhurst, and A. Balmain, 2001, TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression: *Nat Genet*, v. 29, p. 117-29.
- Di Leva, G., M. Garofalo, and C. M. Croce, 2013, MicroRNAs in cancer: *Annu Rev Pathol*, v. 9, p. 287-314.
- Donehower, L. A., M. Harvey, B. L. Slagle, M. J. McArthur, C. A. Montgomery, Jr., J. S. Butel, and A. Bradley, 1992, Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours: *Nature*, v. 356, p. 215-21.
- Duenas, M., M. Santos, J. F. Aranda, C. Bielza, A. B. Martinez-Cruz, C. Lorz, M. Taron, E. M. Ciruelos, J. L. Rodriguez-Peralto, M. Martin, P. Larranaga, J. Dahabreh, G. P. Stathopoulos, R. Rosell, J. M. Paramio, and R. Garcia-Escudero, 2012, Mouse p53-deficient cancer

- models as platforms for obtaining genomic predictors of human cancer clinical outcomes: *PLoS One*, v. 7, p. e42494.
- Dull, T., R. Zufferey, M. Kelly, R. J. Mandel, M. Nguyen, D. Trono, and L. Naldini, 1998, A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system: *J Virol*, v. 72, p. 8463-71.
- Dykxhoorn, D. M., 2010, MicroRNAs and metastasis: little RNAs go a long way: *Cancer Res*, v. 70, p. 6401-6.
- Dyson, N., 1998, The regulation of E2F by pRB-family proteins: *Genes Dev*, v. 12, p. 2245-62.
- Eisemann, N., A. Waldmann, A. C. Geller, M. A. Weinstock, B. Volkmer, R. Greinert, E. W. Breitbart, and A. Katalinic, 2014, Non-melanoma skin cancer incidence and impact of skin cancer screening on incidence: *J Invest Dermatol*, v. 134, p. 43-50.
- Esquela-Kerscher, A., and F. J. Slack, 2006, Oncomirs - microRNAs with a role in cancer: *Nat Rev Cancer*, v. 6, p. 259-69.
- Ewen, M. E., Y. G. Xing, J. B. Lawrence, and D. M. Livingston, 1991, Molecular cloning, chromosomal mapping, and expression of the cDNA for p107, a retinoblastoma gene product-related protein: *Cell*, v. 66, p. 1155-64.
- Feng, Z., W. Hu, E. de Stanchina, A. K. Teresky, S. Jin, S. Lowe, and A. J. Levine, 2007, The regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways: *Cancer Res*, v. 67, p. 3043-53.
- Feng, Z., and A. J. Levine, 2010, The regulation of energy metabolism and the IGF-1/mTOR pathways by the p53 protein: *Trends Cell Biol*, v. 20, p. 427-34.
- Feng, Z., H. Zhang, A. J. Levine, and S. Jin, 2005, The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 102, p. 8204-9.
- Flores, E. R., S. Sengupta, J. B. Miller, J. J. Newman, R. Bronson, D. Crowley, A. Yang, F. McKeon, and T. Jacks, 2005, Tumor predisposition in mice mutant for p63 and p73: evidence for broader tumor suppressor functions for the p53 family: *Cancer Cell*, v. 7, p. 363-73.
- Frezzetti, D., M. De Menna, P. Zoppoli, C. Guerra, A. Ferraro, A. M. Bello, P. De Luca, C. Calabrese, A. Fusco, M. Ceccarelli, M. Zollo, M. Barbacid, R. Di Lauro, and G. De Vita, 2011, Upregulation of miR-21 by Ras in vivo and its role in tumor growth: *Oncogene*, v. 30, p. 275-86.
- Friend, S. H., R. Bernards, S. Rogelj, R. A. Weinberg, J. M. Rapaport, D. M. Albert, and T. P. Dryja, 1986, A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma: *Nature*, v. 323, p. 643-6.
- Frolov, M. V., and N. J. Dyson, 2004, Molecular mechanisms of E2F-dependent activation and pRB-mediated repression: *J Cell Sci*, v. 117, p. 2173-81.
- Gao, J., B. A. Aksoy, U. Dogrusoz, G. Dresdner, B. Gross, S. O. Sumer, Y. Sun, A. Jacobsen, R. Sinha, E. Larsson, E. Cerami, C. Sander, and N. Schultz, 2013, Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal: *Sci Signal*, v. 6, p. pl1.
- Garcia-Escudero, R., A. B. Martinez-Cruz, M. Santos, C. Lorz, C. Segrelles, G. Garaulet, C. Saiz-Ladera, C. Costa, A. Buitrago-Perez, M. Duenas, and J. M. Paramio, 2010, Gene expression



- profiling of mouse p53-deficient epidermal carcinoma defines molecular determinants of human cancer malignancy: *Mol Cancer*, v. 9, p. 193.
- Garfin, P. M., D. Min, J. L. Bryson, T. Serwold, B. Edris, C. C. Blackburn, E. R. Richie, K. I. Weinberg, N. R. Manley, J. Sage, and P. Viatour, 2013, Inactivation of the RB family prevents thymus involution and promotes thymic function by direct control of Foxn1 expression: *J Exp Med*, v. 210, p. 1087-97.
- Goodrich, D. W., 2006, The retinoblastoma tumor-suppressor gene, the exception that proves the rule: *Oncogene*, v. 25, p. 5233-43.
- Gout, S., and J. Huot, 2008, Role of cancer microenvironment in metastasis: focus on colon cancer: *Cancer Microenviron*, v. 1, p. 69-83.
- Grana, X., J. Garriga, and X. Mayol, 1998, Role of the retinoblastoma protein family, pRB, p107 and p130 in the negative control of cell growth: *Oncogene*, v. 17, p. 3365-83.
- Greene, S. B., J. I. Herschkowitz, and J. M. Rosen, 2010, The ups and downs of miR-205: identifying the roles of miR-205 in mammary gland development and breast cancer: *RNA Biol*, v. 7, p. 300-4.
- Gregory, P. A., A. G. Bert, E. L. Paterson, S. C. Barry, A. Tsykin, G. Farshid, M. A. Vadas, Y. Khew-Goodall, and G. J. Goodall, 2008b, The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1: *Nat Cell Biol*, v. 10, p. 593-601.
- Gregory, P. A., C. P. Bracken, A. G. Bert, and G. J. Goodall, 2008a, MicroRNAs as regulators of epithelial-mesenchymal transition: *Cell Cycle*, v. 7, p. 3112-8.
- Hanahan, D., and R. A. Weinberg, 2000, The hallmarks of cancer: *Cell*, v. 100, p. 57-70.
- Hanahan, D., and R. A. Weinberg, 2011, Hallmarks of cancer: the next generation: *Cell*, v. 144, p. 646-74.
- Hannon, G. J., D. Demetrick, and D. Beach, 1993, Isolation of the Rb-related p130 through its interaction with CDK2 and cyclins: *Genes Dev*, v. 7, p. 2378-91.
- Harris, S. L., and A. J. Levine, 2005, The p53 pathway: positive and negative feedback loops: *Oncogene*, v. 24, p. 2899-908.
- Hatley, M. E., D. M. Patrick, M. R. Garcia, J. A. Richardson, R. Bassel-Duby, E. van Rooij, and E. N. Olson, 2010, Modulation of K-Ras-dependent lung tumorigenesis by MicroRNA-21: *Cancer Cell*, v. 18, p. 282-93.
- He, L., X. He, S. W. Lowe, and G. J. Hannon, 2007a, microRNAs join the p53 network--another piece in the tumour-suppression puzzle: *Nat Rev Cancer*, v. 7, p. 819-22.
- He, X., L. He, and G. J. Hannon, 2007b, The guardian's little helper: microRNAs in the p53 tumor suppressor network: *Cancer Res*, v. 67, p. 11099-101.
- Hermeking, H., 2007, p53 enters the microRNA world: *Cancer Cell*, v. 12, p. 414-8.
- Hibi, K., B. Trink, M. Patturajan, W. H. Westra, O. L. Caballero, D. E. Hill, E. A. Ratovitski, J. Jen, and D. Sidransky, 2000, AIS is an oncogene amplified in squamous cell carcinoma: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 97, p. 5462-7.

- Higashikawa, K., S. Yoneda, K. Tobiume, M. Taki, H. Shigeishi, and N. Kamata, 2007, Snail-induced down-regulation of DeltaNp63alpha acquires invasive phenotype of human squamous cell carcinoma: *Cancer Res*, v. 67, p. 9207-13.
- Huangyang, P., and Y. Shang, 2013, Epigenetic regulation of epithelial to mesenchymal transition: *Curr Cancer Drug Targets*, v. 13, p. 973-85.
- Hurford, R. K., Jr., D. Cobrinik, M. H. Lee, and N. Dyson, 1997, pRB and p107/p130 are required for the regulated expression of different sets of E2F responsive genes: *Genes Dev*, v. 11, p. 1447-63.
- Hutton, E., R. D. Paladini, Q. C. Yu, M. Yen, P. A. Coulombe, and E. Fuchs, 1998, Functional differences between keratins of stratified and simple epithelia: *J Cell Biol*, v. 143, p. 487-99.
- Ichimura, K., H. Hanafusa, H. Takimoto, Y. Ohgama, T. Akagi, and K. Shimizu, 2000, Structure of the human retinoblastoma-related p107 gene and its intragenic deletion in a B-cell lymphoma cell line: *Gene*, v. 251, p. 37-43.
- Jonkers, J., and A. Berns, 2002, Conditional mouse models of sporadic cancer: *Nat Rev Cancer*, v. 2, p. 251-65.
- Jonkers, J., R. Meuwissen, H. van der Gulden, H. Peterse, M. van der Valk, and A. Berns, 2001, Synergistic tumor suppressor activity of BRCA2 and p53 in a conditional mouse model for breast cancer: *Nat Genet*, v. 29, p. 418-25.
- Jori, F. P., M. A. Melone, M. A. Napolitano, M. Cipollaro, A. Cascino, A. Giordano, and U. Galderisi, 2005, RB and RB2/p130 genes demonstrate both specific and overlapping functions during the early steps of in vitro neural differentiation of marrow stromal stem cells: *Cell Death Differ*, v. 12, p. 65-77.
- Kataoka, K., D. J. Kim, S. Carbajal, J. L. Clifford, and J. DiGiovanni, 2008, Stage-specific disruption of Stat3 demonstrates a direct requirement during both the initiation and promotion stages of mouse skin tumorigenesis: *Carcinogenesis*, v. 29, p. 1108-14.
- Katoh, Y., and M. Katoh, 2008, Hedgehog signaling, epithelial-to-mesenchymal transition and miRNA (review): *Int J Mol Med*, v. 22, p. 271-5.
- Keyes, W. M., M. Pecoraro, V. Aranda, E. Verneris-Lindahl, W. Li, H. Vogel, X. Guo, E. L. Garcia, T. V. Michurina, G. Enikolopov, S. K. Muthuswamy, and A. A. Mills, 2011, DeltaNp63alpha is an oncogene that targets chromatin remodeler Lsh to drive skin stem cell proliferation and tumorigenesis: *Cell Stem Cell*, v. 8, p. 164-76.
- Kim, N. H., H. S. Kim, X. Y. Li, I. Lee, H. S. Choi, S. E. Kang, S. Y. Cha, J. K. Ryu, D. Yoon, E. R. Fearon, R. G. Rowe, S. Lee, C. A. Maher, S. J. Weiss, and J. I. Yook, 2011a, A p53/miRNA-34 axis regulates Snail1-dependent cancer cell epithelial-mesenchymal transition: *J Cell Biol*, v. 195, p. 417-33.
- Kim, T., A. Veronese, F. Pichiorri, T. J. Lee, Y. J. Jeon, S. Volinia, P. Pineau, A. Marchio, J. Palatini, S. S. Suh, H. Alder, C. G. Liu, A. Dejean, and C. M. Croce, 2011b, p53 regulates epithelial-mesenchymal transition through microRNAs targeting ZEB1 and ZEB2: *J Exp Med*, v. 208, p. 875-83.
- Koga, F., S. Kawakami, Y. Fujii, K. Saito, Y. Ohtsuka, A. Iwai, N. Ando, T. Takizawa, Y. Kageyama, and K. Kihara, 2003, Impaired p63 expression associates with poor prognosis and

- uroplakin III expression in invasive urothelial carcinoma of the bladder: *Clin Cancer Res*, v. 9, p. 5501-7.
- Kondo, T., H. Higashi, H. Nishizawa, S. Ishikawa, S. Ashizawa, M. Yamada, Z. Makita, T. Koike, and M. Hatakeyama, 2001, Involvement of pRB-related p107 protein in the inhibition of S phase progression in response to genotoxic stress: *J Biol Chem*, v. 276, p. 17559-67.
- Korpai, M., E. S. Lee, G. Hu, and Y. Kang, 2008, The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2: *J Biol Chem*, v. 283, p. 14910-4.
- Koster, M. I., D. Dai, B. Marinari, Y. Sano, A. Costanzo, M. Karin, and D. R. Roop, 2007, p63 induces key target genes required for epidermal morphogenesis: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 104, p. 3255-60.
- Koster, M. I., S. Kim, A. A. Mills, F. J. DeMayo, and D. R. Roop, 2004, p63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program: *Genes Dev*, v. 18, p. 126-31.
- Kouwenhoven, E. N., S. J. van Heeringen, J. J. Tena, M. Oti, B. E. Dutilh, M. E. Alonso, E. de la Calle-Mustienes, L. Smeenk, T. Rinne, L. Parsaulian, E. Bolat, R. Jurgelenaite, M. A. Huynen, A. Hoischen, J. A. Veltman, H. G. Brunner, T. Roscioli, E. Oates, M. Wilson, M. Manzanares, J. L. Gomez-Skarmeta, H. G. Stunnenberg, M. Lohrum, H. van Bokhoven, and H. Zhou, 2010, Genome-wide profiling of p63 DNA-binding sites identifies an element that regulates gene expression during limb development in the 7q21 SHFM1 locus: *PLoS Genet*, v. 6, p. e1001065.
- Krichevsky, A. M., and G. Gabriely, 2009, miR-21: a small multi-faceted RNA: *J Cell Mol Med*, v. 13, p. 39-53.
- Kuperwasser, C., S. Dessain, B. E. Bierbaum, D. Garnet, K. Sperandio, G. P. Gauvin, S. P. Naber, R. A. Weinberg, and M. Rosenblatt, 2005, A mouse model of human breast cancer metastasis to human bone: *Cancer Res*, v. 65, p. 6130-8.
- Laird, P. W., A. Zijderveld, K. Linders, M. A. Rudnicki, R. Jaenisch, and A. Berns, 1991, Simplified mammalian DNA isolation procedure: *Nucleic Acids Res*, v. 19, p. 4293.
- Landi, M. T., Y. Zhao, M. Rotunno, J. Koshiol, H. Liu, A. W. Bergen, M. Rubagotti, A. M. Goldstein, I. Linnoila, F. M. Marincola, M. A. Tucker, P. A. Bertazzi, A. C. Pesatori, N. E. Caporaso, L. M. McShane, and E. Wang, 2010, MicroRNA expression differentiates histology and predicts survival of lung cancer: *Clin Cancer Res*, v. 16, p. 430-41.
- Lane, D. P., 1992, Cancer. p53, guardian of the genome: *Nature*, v. 358, p. 15-6.
- Lara, M. F., R. Garcia-Escudero, S. Ruiz, M. Santos, M. Moral, A. B. Martinez-Cruz, C. Segrelles, C. Lorz, and J. M. Paramio, 2008a, Gene profiling approaches help to define the specific functions of retinoblastoma family in epidermis: *Mol Carcinog*, v. 47, p. 209-21.
- Lara, M. F., M. Santos, S. Ruiz, C. Segrelles, M. Moral, A. B. Martinez-Cruz, P. Hernandez, J. Martinez-Palacio, C. Lorz, R. Garcia-Escudero, and J. M. Paramio, 2008b, p107 acts as a tumor suppressor in pRb-deficient epidermis: *Mol Carcinog*, v. 47, p. 105-13.
- Lee, C., J. H. Chang, H. S. Lee, and Y. Cho, 2002, Structural basis for the recognition of the E2F transactivation domain by the retinoblastoma tumor suppressor: *Genes Dev*, v. 16, p. 3199-212.

- Lee, M. H., B. O. Williams, G. Mulligan, S. Mukai, R. T. Bronson, N. Dyson, E. Harlow, and T. Jacks, 1996, Targeted disruption of p107: functional overlap between p107 and Rb: *Genes Dev*, v. 10, p. 1621-32.
- Lee, W. H., J. Y. Shew, F. D. Hong, T. W. Sery, L. A. Donoso, L. J. Young, R. Bookstein, and E. Y. Lee, 1987, The retinoblastoma susceptibility gene encodes a nuclear phosphoprotein associated with DNA binding activity: *Nature*, v. 329, p. 642-5.
- Leigh, I. M., Birgitte Lane, E. y Watt, F.M, 1994, *The keratinocyte handbook* Cambridge University Press: Cambridge., p. 131-152.
- Lena, A. M., R. Shalom-Feuerstein, P. Rivetti di Val Cervo, D. Aberdam, R. A. Knight, G. Melino, and E. Candi, 2008, miR-203 represses 'stemness' by repressing DeltaNp63: *Cell Death Differ*, v. 15, p. 1187-95.
- Leoncini, L., C. Bellan, A. Cossu, P. P. Claudio, S. Lazzi, C. Cinti, G. Cevenini, T. Megha, L. Laurini, P. Luzi, G. F. Orcioni, M. Piccioli, S. Pileri, C. Giardino, P. Tosi, and A. Giordano, 1999, Retinoblastoma-related p107 and pRb2/p130 proteins in malignant lymphomas: distinct mechanisms of cell growth control: *Clin Cancer Res*, v. 5, p. 4065-72.
- Levine, A. J., R. Tomasini, F. D. McKeon, T. W. Mak, and G. Melino, 2011, The p53 family: guardians of maternal reproduction: *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 12, p. 259-65.
- Lin, J., X. Jin, K. Rothman, H. J. Lin, H. Tang, and W. Burke, 2002a, Modulation of signal transducer and activator of transcription 3 activities by p53 tumor suppressor in breast cancer cells: *Cancer Res*, v. 62, p. 376-80.
- Lin, J., H. Tang, X. Jin, G. Jia, and J. T. Hsieh, 2002b, p53 regulates Stat3 phosphorylation and DNA binding activity in human prostate cancer cells expressing constitutively active Stat3: *Oncogene*, v. 21, p. 3082-8.
- Lindeman, G. J., S. Gaubatz, D. M. Livingston, and D. Ginsberg, 1997, The subcellular localization of E2F-4 is cell-cycle dependent: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 94, p. 5095-100.
- Lipinski, M. M., and T. Jacks, 1999, The retinoblastoma gene family in differentiation and development: *Oncogene*, v. 18, p. 7873-82.
- Loffler, D., K. Brocke-Heidrich, G. Pfeifer, C. Stocsits, J. Hackermuller, A. K. Kretzschmar, R. Burger, M. Gramatzki, C. Blumert, K. Bauer, H. Cvijic, A. K. Ullmann, P. F. Stadler, and F. Horn, 2007, Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer: *Blood*, v. 110, p. 1330-3.
- Lomas, A., J. Leonardi-Bee, and F. Bath-Hextall, 2012, A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer: *Br J Dermatol*, v. 166, p. 1069-80.
- Ma, J., Y. Meng, D. J. Kwiatkowski, X. Chen, H. Peng, Q. Sun, X. Zha, F. Wang, Y. Wang, Y. Jing, S. Zhang, R. Chen, L. Wang, E. Wu, G. Cai, I. Malinowska-Kolodziej, Q. Liao, Y. Liu, Y. Zhao, Q. Sun, K. Xu, J. Dai, J. Han, L. Wu, R. C. Zhao, H. Shen, and H. Zhang, 2010, Mammalian target of rapamycin regulates murine and human cell differentiation through STAT3/p63/Jagged/Notch cascade: *J Clin Invest*, v. 120, p. 103-14.
- Ma, L., and R. A. Weinberg, 2008a, Micromanagers of malignancy: role of microRNAs in regulating metastasis: *Trends Genet*, v. 24, p. 448-56.

- Ma, L., and R. A. Weinberg, 2008b, MicroRNAs in malignant progression: *Cell Cycle*, v. 7, p. 570-2.
- Ma, X., M. Kumar, S. N. Choudhury, L. E. Becker Buscaglia, J. R. Barker, K. Kanakamedala, M. F. Liu, and Y. Li, 2011, Loss of the miR-21 allele elevates the expression of its target genes and reduces tumorigenesis: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 108, p. 10144-9.
- Marchenko, N. D., A. Zaika, and U. M. Moll, 2000, Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling: *J Biol Chem*, v. 275, p. 16202-12.
- Martinez-Cruz, A. B., M. Santos, R. Garcia-Escudero, M. Moral, C. Segrelles, C. Lorz, C. Saiz, A. Buitrago-Perez, C. Costa, and J. M. Paramio, 2009, Spontaneous tumor formation in Trp53-deficient epidermis mediated by chromosomal instability and inflammation: *Anticancer Res*, v. 29, p. 3035-42.
- Martinez-Cruz, A. B., M. Santos, M. F. Lara, C. Segrelles, S. Ruiz, M. Moral, C. Lorz, R. Garcia-Escudero, and J. M. Paramio, 2008, Spontaneous squamous cell carcinoma induced by the somatic inactivation of retinoblastoma and Trp53 tumor suppressors: *Cancer Res*, v. 68, p. 683-92.
- Martínez-Fernández M\*, D. M., Feber A., Segovia C, García-Escudero R, Rubio C, Villacampa F, Duarte J, Gómez MJ, Castellano D, Rodríguez-Peralto JL, de la Rosa F, Beck S. and Paramio JM., 2015, A Polycomb-mir200s loop regulates clinical outcome in bladder cancer: *Oncogene*, v. (enviado).
- Massaro-Giordano, M., G. Baldi, A. De Luca, A. Baldi, and A. Giordano, 1999, Differential expression of the retinoblastoma gene family members in choroidal melanoma: prognostic significance: *Clin Cancer Res*, v. 5, p. 1455-8.
- Mayol, X., X. Grana, A. Baldi, N. Sang, Q. Hu, and A. Giordano, 1993, Cloning of a new member of the retinoblastoma gene family (pRb2) which binds to the E1A transforming domain: *Oncogene*, v. 8, p. 2561-6.
- McConkey, D. J., W. Choi, L. Marquis, F. Martin, M. B. Williams, J. Shah, R. Svatek, A. Das, L. Adam, A. Kamat, A. Siefker-Radtke, and C. Dinney, 2009, Role of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in drug sensitivity and metastasis in bladder cancer: *Cancer Metastasis Rev*, v. 28, p. 335-44.
- McDade, S. S., A. E. Henry, G. P. Pivato, I. Kozarewa, C. Mitsopoulos, K. Fenwick, I. Assiotis, J. Hakas, M. Zvelebil, N. Orr, C. J. Lord, D. Patel, A. Ashworth, and D. J. McCance, 2012, Genome-wide analysis of p63 binding sites identifies AP-2 factors as co-regulators of epidermal differentiation: *Nucleic Acids Res*, v. 40, p. 7190-206.
- McGuire, A., J. A. Brown, and M. J. Kerin, 2015, Metastatic breast cancer: the potential of miRNA for diagnosis and treatment monitoring: *Cancer Metastasis Rev*.
- Megraw, M., P. Sethupathy, B. Corda, and A. G. Hatzigeorgiou, 2007, miRGen: a database for the study of animal microRNA genomic organization and function: *Nucleic Acids Res*, v. 35, p. D149-55.
- Melino, G., 2011, p63 is a suppressor of tumorigenesis and metastasis interacting with mutant p53: *Cell Death Differ*, v. 18, p. 1487-99.
- Meng, F., R. Henson, H. Wehbe-Janek, K. Ghoshal, S. T. Jacob, and T. Patel, 2007, MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer: *Gastroenterology*, v. 133, p. 647-58.

- Mihara, M., S. Erster, A. Zaika, O. Petrenko, T. Chittenden, P. Pancoska, and U. M. Moll, 2003, p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria: *Mol Cell*, v. 11, p. 577-90.
- Mills, A. A., Y. Qi, and A. Bradley, 2002, Conditional inactivation of p63 by Cre-mediated excision: *Genesis*, v. 32, p. 138-41.
- Mills, A. A., B. Zheng, X. J. Wang, H. Vogel, D. R. Roop, and A. Bradley, 1999, p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis: *Nature*, v. 398, p. 708-13.
- Moberg, K., M. A. Starz, and J. A. Lees, 1996, E2F-4 switches from p130 to p107 and pRB in response to cell cycle reentry: *Mol Cell Biol*, v. 16, p. 1436-49.
- Moreno-Bueno, G., F. Portillo, and A. Cano, 2008, Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer: *Oncogene*, v. 27, p. 6958-69.
- Morris, E. J., and N. J. Dyson, 2001, Retinoblastoma protein partners: *Adv Cancer Res*, v. 82, p. 1-54.
- Moustakas, A., and C. H. Heldin, 2007, Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression: *Cancer Sci*, v. 98, p. 1512-20.
- Muller, P. A., P. T. Caswell, B. Doyle, M. P. Iwanicki, E. H. Tan, S. Karim, N. Lukashchuk, D. A. Gillespie, R. L. Ludwig, P. Gosselin, A. Cromer, J. S. Brugge, O. J. Sansom, J. C. Norman, and K. H. Vousden, 2009, Mutant p53 drives invasion by promoting integrin recycling: *Cell*, v. 139, p. 1327-41.
- Mulligan, G., and T. Jacks, 1998, The retinoblastoma gene family: cousins with overlapping interests: *Trends Genet*, v. 14, p. 223-9.
- Nevins, J. R., 1998, Toward an understanding of the functional complexity of the E2F and retinoblastoma families: *Cell Growth Differ*, v. 9, p. 585-93.
- Oh, J. E., R. H. Kim, K. H. Shin, N. H. Park, and M. K. Kang, 2011, DeltaNp63alpha protein triggers epithelial-mesenchymal transition and confers stem cell properties in normal human keratinocytes: *J Biol Chem*, v. 286, p. 38757-67.
- Olsen, J. R., A. M. Oyan, K. Rostad, M. R. Hellem, J. Liu, L. Li, D. R. Micklem, H. Haugen, J. B. Lorens, V. Rotter, X. S. Ke, B. Lin, and K. H. Kalland, 2013, p63 attenuates epithelial to mesenchymal potential in an experimental prostate cell model: *PLoS One*, v. 8, p. e62547.
- Onda, H., P. B. Crino, H. Zhang, R. D. Murphey, L. Rastelli, B. E. Gould Rothberg, and D. J. Kwiatkowski, 2002, Tsc2 null murine neuroepithelial cells are a model for human tuber giant cells, and show activation of an mTOR pathway: *Mol Cell Neurosci*, v. 21, p. 561-74.
- Oren, M., 2003, Decision making by p53: life, death and cancer: *Cell Death Differ*, v. 10, p. 431-42.
- Padua, D., X. H. Zhang, Q. Wang, C. Nadal, W. L. Gerald, R. R. Gomis, and J. Massague, 2008, TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4: *Cell*, v. 133, p. 66-77.
- Paggi, M. G., A. Baldi, F. Bonetto, and A. Giordano, 1996, Retinoblastoma protein family in cell cycle and cancer: a review: *J Cell Biochem*, v. 62, p. 418-30.
- Papagiannakopoulos, T., A. Shapiro, and K. S. Kosik, 2008, MicroRNA-21 targets a network of key tumor-suppressive pathways in glioblastoma cells: *Cancer Res*, v. 68, p. 8164-72.

- Paradela, B., 2011, Analysis of the tumor suppressor and oncogenic roles of p63, Madrid.
- Park, B. J., S. J. Lee, J. I. Kim, S. J. Lee, C. H. Lee, S. G. Chang, J. H. Park, and S. G. Chi, 2000, Frequent alteration of p63 expression in human primary bladder carcinomas: *Cancer Res*, v. 60, p. 3370-4.
- Park, H. R., Y. W. Kim, J. H. Park, Y. H. Maeng, T. Nojima, H. Hashimoto, and Y. K. Park, 2004, Low expression of p63 and p73 in osteosarcoma: *Tumori*, v. 90, p. 239-43.
- Parkin, D. M., 1998, Epidemiology of cancer: global patterns and trends: *Toxicol Lett*, v. 102-103, p. 227-34.
- Peinado, H., D. Olmeda, and A. Cano, 2007, Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?: *Nat Rev Cancer*, v. 7, p. 415-28.
- Peinado, H., M. Quintanilla, and A. Cano, 2003, Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions: *J Biol Chem*, v. 278, p. 21113-23.
- Pelleitier, M., and S. Montplaisir, 1975, The nude mouse: a model of deficient T-cell function: *Methods Achiev Exp Pathol*, v. 7, p. 149-66.
- Pertile, P., A. Baldi, A. De Luca, L. Bagella, L. Virgilio, M. M. Pisano, and A. Giordano, 1995, Molecular cloning, expression, and developmental characterization of the murine retinoblastoma-related gene Rb2/p130: *Cell Growth Differ*, v. 6, p. 1659-64.
- Petitjean, A., M. I. Achatz, A. L. Borresen-Dale, P. Hainaut, and M. Olivier, 2007, TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes: *Oncogene*, v. 26, p. 2157-65.
- Pezzolesi, M. G., P. Platzer, K. A. Waite, and C. Eng, 2008, Differential expression of PTEN-targeting microRNAs miR-19a and miR-21 in Cowden syndrome: *Am J Hum Genet*, v. 82, p. 1141-9.
- Piccolo, S., 2008, p53 regulation orchestrates the TGF-beta response: *Cell*, v. 133, p. 767-9.
- Piccolo, S., E. Enzo, and M. Montagner, 2013, p63, Sharp1, and HIFs: master regulators of metastasis in triple-negative breast cancer: *Cancer Res*, v. 73, p. 4978-81.
- Ramirez, A., A. Bravo, J. L. Jorcano, and M. Vidal, 1994, Sequences 5' of the bovine keratin 5 gene direct tissue- and cell-type-specific expression of a lacZ gene in the adult and during development: *Differentiation*, v. 58, p. 53-64.
- Ramirez, A., M. Vidal, A. Bravo, F. Larcher, and J. L. Jorcano, 1995, A 5'-upstream region of a bovine keratin 6 gene confers tissue-specific expression and hyperproliferation-related induction in transgenic mice: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 92, p. 4783-7.
- Raponi, M., L. Dossey, T. Jatkoe, X. Wu, G. Chen, H. Fan, and D. G. Beer, 2009, MicroRNA classifiers for predicting prognosis of squamous cell lung cancer: *Cancer Res*, v. 69, p. 5776-83.
- Raver-Shapira, N., and M. Oren, 2007, Tiny actors, great roles: microRNAs in p53's service: *Cell Cycle*, v. 6, p. 2656-61.
- Rinnerthaler, M., M. K. Streubel, J. Bischof, and K. Richter, 2014, Skin aging, gene expression and calcium: *Exp Gerontol*.

- Robanus-Maandag, E., M. Dekker, M. van der Valk, M. L. Carrozza, J. C. Jeanny, J. H. Dannenberg, A. Berns, and H. te Riele, 1998, p107 is a suppressor of retinoblastoma development in pRb-deficient mice: *Genes Dev*, v. 12, p. 1599-609.
- Robles, A. I., F. Larcher, R. B. Whalin, R. Murillas, E. Richie, I. B. Gimenez-Conti, J. L. Jorcano, and C. J. Conti, 1996, Expression of cyclin D1 in epithelial tissues of transgenic mice results in epidermal hyperproliferation and severe thymic hyperplasia: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 93, p. 7634-8.
- Ruiz, S., M. Santos, M. F. Lara, C. Segrelles, C. Ballestin, and J. M. Paramio, 2005, Unexpected roles for pRb in mouse skin carcinogenesis: *Cancer Res*, v. 65, p. 9678-86.
- Ruiz, S., M. Santos, and J. M. Paramio, 2006, Is the loss of pRb essential for the mouse skin carcinogenesis?: *Cell Cycle*, v. 5, p. 625-9.
- Ruiz, S., M. Santos, C. Segrelles, H. Leis, J. L. Jorcano, A. Berns, J. M. Paramio, and M. Vooijs, 2004, Unique and overlapping functions of pRb and p107 in the control of proliferation and differentiation in epidermis: *Development*, v. 131, p. 2737-48.
- Ruiz, S., C. Segrelles, A. Bravo, M. Santos, P. Perez, H. Leis, J. L. Jorcano, and J. M. Paramio, 2003, Abnormal epidermal differentiation and impaired epithelial-mesenchymal tissue interactions in mice lacking the retinoblastoma relatives p107 and p130: *Development*, v. 130, p. 2341-53.
- Saeed, A. I., V. Sharov, J. White, J. Li, W. Liang, N. Bhagabati, J. Braisted, M. Klapa, T. Currier, M. Thiagarajan, A. Sturn, M. Snuffin, A. Rezantsev, D. Popov, A. Ryltsov, E. Kostukovich, I. Borisovsky, Z. Liu, A. Vinsavich, V. Trush, and J. Quackenbush, 2003, TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis: *Biotechniques*, v. 34, p. 374-8.
- Sage, J., A. L. Miller, P. A. Perez-Mancera, J. M. Wysocki, and T. Jacks, 2003, Acute mutation of retinoblastoma gene function is sufficient for cell cycle re-entry: *Nature*, v. 424, p. 223-8.
- Saiz-Ladera, C., M. F. Lara, M. Garin, S. Ruiz, M. Santos, C. Lorz, R. Garcia-Escudero, M. Martinez-Fernandez, A. Bravo, O. Fernandez-Capetillo, C. Segrelles, and J. M. Paramio, 2014, p21 suppresses inflammation and tumorigenesis on pRB-deficient stratified epithelia: *Oncogene*, v. 33, p. 4599-612.
- Sambrook, J., 1989, *Molecular cloning : a laboratory manual* / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis., New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Sand, M., T. Gambichler, M. Skrygan, D. Sand, N. Scola, P. Altmeyer, and F. G. Bechara, 2010, Expression levels of the microRNA processing enzymes Drosha and Dicer in epithelial skin cancer: *Cancer Invest*, v. 28, p. 649-53.
- Santos, M., M. Martinez-Fernandez, M. Duenas, R. Garcia-Escudero, B. Alfaya, F. Villacampa, C. Saiz-Ladera, C. Costa, M. Oteo, J. Duarte, V. Martinez, M. J. Gomez-Rodriguez, M. L. Martin, M. Fernandez, P. Viatour, M. A. Morcillo, J. Sage, D. Castellano, J. L. Rodriguez-Peralto, F. de la Rosa, and J. M. Paramio, 2014, In vivo disruption of an Rb-E2F-Ezh2 signaling loop causes bladder cancer: *Cancer Res*, v. 74, p. 6565-77.
- Santos, M., J. M. Paramio, A. Bravo, A. Ramirez, and J. L. Jorcano, 2002, The expression of keratin k10 in the basal layer of the epidermis inhibits cell proliferation and prevents skin tumorigenesis: *J Biol Chem*, v. 277, p. 19122-30.



- Sauer, B., 1998, Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system: *Methods*, v. 14, p. 381-92.
- Sayed, D., S. Rane, J. Lypowy, M. He, I. Y. Chen, H. Vashistha, L. Yan, A. Malhotra, D. Vatner, and M. Abdellatif, 2008, MicroRNA-21 targets Sprouty2 and promotes cellular outgrowths: *Mol Biol Cell*, v. 19, p. 3272-82.
- Schaffer, B. E., K. S. Park, G. Yiu, J. F. Conklin, C. Lin, D. L. Burkhardt, A. N. Karnezis, E. A. Sweet-Cordero, and J. Sage, 2010, Loss of p130 accelerates tumor development in a mouse model for human small-cell lung carcinoma: *Cancer Res*, v. 70, p. 3877-83.
- Schoop, V. M., N. Mirancea, and N. E. Fusenig, 1999, Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts: *J Invest Dermatol*, v. 112, p. 343-53.
- Segrelles, C., A. Holguin, P. Hernandez, J. M. Ariza, J. M. Paramio, and C. Lorz, 2011, Establishment of a murine epidermal cell line suitable for in vitro and in vivo skin modelling: *BMC Dermatol*, v. 11, p. 9.
- Segrelles, C., S. Ruiz, P. Perez, C. Murga, M. Santos, I. V. Budunova, J. Martinez, F. Larcher, T. J. Slaga, J. S. Gutkind, J. L. Jorcano, and J. M. Paramio, 2002, Functional roles of Akt signaling in mouse skin tumorigenesis: *Oncogene*, v. 21, p. 53-64.
- Segrelles, C., S. Ruiz, M. Santos, J. Martinez-Palacio, M. F. Lara, and J. M. Paramio, 2004, Akt mediates an angiogenic switch in transformed keratinocytes: *Carcinogenesis*, v. 25, p. 1137-47.
- Seike M, G. A., Okano T, Bowman ED, Schetter AJ, Horikawa I, Mathe EA, Jen J, Yang P, Sugimura H, Gemma A, Kudoh S, Croce CM, Harris CC., 2009, MiR-21 is an EGFR-regulated anti-apoptotic factor in lung cancer in never-smokers.: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 106, p. 12085–12090.
- Selcuklu, S. D., M. T. Donoghue, and C. Spillane, 2009, miR-21 as a key regulator of oncogenic processes: *Biochem Soc Trans*, v. 37, p. 918-25.
- Senoo, M., F. Pinto, C. P. Crum, and F. McKeon, 2007, p63 Is essential for the proliferative potential of stem cells in stratified epithelia: *Cell*, v. 129, p. 523-36.
- Shedden, K., J. M. Taylor, S. A. Enkemann, M. S. Tsao, T. J. Yeatman, W. L. Gerald, S. Eschrich, I. Jurisica, T. J. Giordano, D. E. Misek, A. C. Chang, C. Q. Zhu, D. Strumpf, S. Hanash, F. A. Shepherd, K. Ding, L. Seymour, K. Naoki, N. Pennell, B. Weir, R. Verhaak, C. Ladd-Acosta, T. Golub, M. Gruidl, A. Sharma, J. Szoke, M. Zakowski, V. Rusch, M. Kris, A. Viale, N. Motoi, W. Travis, B. Conley, V. E. Seshan, M. Meyerson, R. Kuick, K. K. Dobbin, T. Lively, J. W. Jacobson, and D. G. Beer, 2008, Gene expression-based survival prediction in lung adenocarcinoma: a multi-site, blinded validation study: *Nat Med*, v. 14, p. 822-7.
- Shenouda, S. K., and S. K. Alahari, 2009, MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor?: *Cancer Metastasis Rev*, v. 28, p. 369-78.
- Sherr, C. J., and F. McCormick, 2002, The RB and p53 pathways in cancer: *Cancer Cell*, v. 2, p. 103-12.
- Sinha, S., and E. Fuchs, 2001, Identification and dissection of an enhancer controlling epithelial gene expression in skin: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 98, p. 2455-60.

- Smit, M. A., and D. S. Peeper, 2008, Deregulating EMT and senescence: double impact by a single twist: *Cancer Cell*, v. 14, p. 5-7.
- Steinert, P. M., and L. N. Marekov, 1995, The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin, and small proline-rich proteins 1 and 2 are isodipeptide cross-linked components of the human epidermal cornified cell envelope: *J Biol Chem*, v. 270, p. 17702-11.
- Su, X., D. Chakravarti, M. S. Cho, L. Liu, Y. J. Gi, Y. L. Lin, M. L. Leung, A. El-Naggar, C. J. Creighton, M. B. Suraokar, I. Wistuba, and E. R. Flores, 2010, TAp63 suppresses metastasis through coordinate regulation of Dicer and miRNAs: *Nature*, v. 467, p. 986-90.
- Suh, E. K., A. Yang, A. Kettenbach, C. Bamberger, A. H. Michaelis, Z. Zhu, J. A. Elvin, R. T. Bronson, C. P. Crum, and F. McKeon, 2006, p63 protects the female germ line during meiotic arrest: *Nature*, v. 444, p. 624-8.
- Suzuki, H. I., and K. Miyazono, 2010, Dynamics of microRNA biogenesis: crosstalk between p53 network and microRNA processing pathway: *J Mol Med (Berl)*, v. 88, p. 1085-94.
- Tarang, S., S. M. Doi, C. B. Gurumurthy, D. Harms, R. Quadros, and S. M. Rocha-Sanchez, 2015, Generation of a Retinoblastoma (Rb)1-inducible dominant-negative (DN) mouse model: *Front Cell Neurosci*, v. 9, p. 52.
- Testoni, B., S. Borrelli, E. Tenedini, D. Alotto, C. Castagnoli, S. Piccolo, E. Tagliafico, S. Ferrari, M. A. Vigano, and R. Mantovani, 2006, Identification of new p63 targets in human keratinocytes: *Cell Cycle*, v. 5, p. 2805-11.
- Thiery, J. P., 2002, Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression: *Nat Rev Cancer*, v. 2, p. 442-54.
- Toledo, F., and G. M. Wahl, 2006, Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas: *Nat Rev Cancer*, v. 6, p. 909-23.
- Tonon, G., C. Brennan, A. Protopopov, G. Maulik, B. Feng, Y. Zhang, D. B. Khatry, M. J. You, A. J. Aguirre, E. S. Martin, Z. Yang, H. Ji, L. Chin, K. K. Wong, and R. A. Depinho, 2005, Common and contrasting genomic profiles among the major human lung cancer subtypes: *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, v. 70, p. 11-24.
- Tran, M. N., W. Choi, M. F. Wszolek, N. Navai, I. L. Lee, G. Nitti, S. Wen, E. R. Flores, A. Siefker-Radtke, B. Czerniak, C. Dinney, M. Barton, and D. J. McConkey, 2013, The p63 protein isoform DeltaNp63alpha inhibits epithelial-mesenchymal transition in human bladder cancer cells: role of MIR-205: *J Biol Chem*, v. 288, p. 3275-88.
- Tucci, P., M. Agostini, F. Grespi, E. K. Markert, A. Terrinoni, K. H. Vousden, P. A. Muller, V. Dotsch, S. Kehrloesser, B. S. Sayan, G. Giaccone, S. W. Lowe, N. Takahashi, P. Vandenabeele, R. A. Knight, A. J. Levine, and G. Melino, 2012, Loss of p63 and its microRNA-205 target results in enhanced cell migration and metastasis in prostate cancer: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 109, p. 15312-7.
- Urist, M. J., C. J. Di Como, M. L. Lu, E. Charytonowicz, D. Verbel, C. P. Crum, T. A. Ince, F. D. McKeon, and C. Cordon-Cardo, 2002, Loss of p63 expression is associated with tumor progression in bladder cancer: *Am J Pathol*, v. 161, p. 1199-206.

- Vasioukhin, V., L. Degenstein, B. Wise, and E. Fuchs, 1999, The magical touch: genome targeting in epidermal stem cells induced by tamoxifen application to mouse skin: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 96, p. 8551-6.
- Viatour, P., T. C. Somervaille, S. Venkatasubrahmanyam, S. Kogan, M. E. McLaughlin, I. L. Weissman, A. J. Butte, E. Passegue, and J. Sage, 2008, Hematopoietic stem cell quiescence is maintained by compound contributions of the retinoblastoma gene family: *Cell Stem Cell*, v. 3, p. 416-28.
- Vigano, M. A., J. Lamartine, B. Testoni, D. Merico, D. Alotto, C. Castagnoli, A. Robert, E. Candi, G. Melino, X. Gidrol, and R. Mantovani, 2006, New p63 targets in keratinocytes identified by a genome-wide approach: *Embo J*, v. 25, p. 5105-16.
- Vivanco, I., and C. L. Sawyers, 2002, The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer: *Nat Rev Cancer*, v. 2, p. 489-501.
- Volinia, S., G. A. Calin, C. G. Liu, S. Ambbs, A. Cimmino, F. Petrocca, R. Visone, M. Iorio, C. Roldo, M. Ferracin, R. L. Prueitt, N. Yanaihara, G. Lanza, A. Scarpa, A. Vecchione, M. Negrini, C. C. Harris, and C. M. Croce, 2006, A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 103, p. 2257-61.
- Vousden, K. H., and X. Lu, 2002, Live or let die: the cell's response to p53: *Nat Rev Cancer*, v. 2, p. 594-604.
- Wahl, G. M., and A. M. Carr, 2001, The evolution of diverse biological responses to DNA damage: insights from yeast and p53: *Nat Cell Biol*, v. 3, p. E277-86.
- Wang, Z., Y. Li, A. Ahmad, A. S. Azmi, D. Kong, S. Banerjee, and F. H. Sarkar, 2010, Targeting miRNAs involved in cancer stem cell and EMT regulation: An emerging concept in overcoming drug resistance: *Drug Resist Updat*, v. 13, p. 109-18.
- Weinberg, R. A., 1995, The retinoblastoma protein and cell cycle control: *Cell*, v. 81, p. 323-30.
- Wu, C. Y., Y. P. Tsai, M. Z. Wu, S. C. Teng, and K. J. Wu, 2012, Epigenetic reprogramming and post-transcriptional regulation during the epithelial-mesenchymal transition: *Trends Genet*, v. 28, p. 454-63.
- Xing, Y., and K. A. Hogquist, 2014, Isolation, identification, and purification of murine thymic epithelial cells: *J Vis Exp*, p. e51780.
- Yang, A., R. Schweitzer, D. Sun, M. Kaghad, N. Walker, R. T. Bronson, C. Tabin, A. Sharpe, D. Caput, C. Crum, and F. McKeon, 1999, p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development: *Nature*, v. 398, p. 714-8.
- Yang, A., Z. Zhu, P. Kapranov, F. McKeon, G. M. Church, T. R. Gingeras, and K. Struhl, 2006, Relationships between p63 binding, DNA sequence, transcription activity, and biological function in human cells: *Mol Cell*, v. 24, p. 593-602.
- Yeung, R. S., D. W. Bell, J. R. Testa, X. Mayol, A. Baldi, X. Grana, K. Klinga-Levan, A. G. Knudson, and A. Giordano, 1993, The retinoblastoma-related gene, RB2, maps to human chromosome 16q12 and rat chromosome 19: *Oncogene*, v. 8, p. 3465-8.
- Yi, R., D. O'Carroll, H. A. Pasolli, Z. Zhang, F. S. Dietrich, A. Tarakhovsky, and E. Fuchs, 2006, Morphogenesis in skin is governed by discrete sets of differentially expressed microRNAs: *Nat Genet*, v. 38, p. 356-62.

- Yi, R., M. N. Poy, M. Stoffel, and E. Fuchs, 2008, A skin microRNA promotes differentiation by repressing 'stemness': *Nature*, v. 452, p. 225-9.
- Yu, S. L., H. Y. Chen, G. C. Chang, C. Y. Chen, H. W. Chen, S. Singh, C. L. Cheng, C. J. Yu, Y. C. Lee, H. S. Chen, T. J. Su, C. C. Chiang, H. N. Li, Q. S. Hong, H. Y. Su, C. C. Chen, W. J. Chen, C. C. Liu, W. K. Chan, W. J. Chen, K. C. Li, J. J. Chen, and P. C. Yang, 2008, MicroRNA signature predicts survival and relapse in lung cancer: *Cancer Cell*, v. 13, p. 48-57.
- Yuspa, S. H., D. Morgan, U. Lichti, E. F. Spangler, D. Michael, A. Kilkenny, and H. Hennings, 1986, Cultivation and characterization of cells derived from mouse skin papillomas induced by an initiation-promotion protocol: *Carcinogenesis*, v. 7, p. 949-58.
- Zavadil, J., M. Narasimhan, M. Blumenberg, and R. J. Schneider, 2007, Transforming growth factor-beta and microRNA:mRNA regulatory networks in epithelial plasticity: *Cells Tissues Organs*, v. 185, p. 157-61.
- Zhang, H., Y. Li, and M. Lai, 2010, The microRNA network and tumor metastasis: *Oncogene*, v. 29, p. 937-48.
- Zheng, L., and W. H. Lee, 2001, The retinoblastoma gene: a prototypic and multifunctional tumor suppressor: *Exp Cell Res*, v. 264, p. 2-18.

*Anexo*

